MARIANA SARDINHA BUENO

**Caracterização fenotípica e molecular da resistência
antimicrobiana e relação genética em isolados clínicos de
clones de alto risco de *Acinetobacter baumannii***

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de
2011)

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

MARIANA SARDINHA BUENO

**Caracterização fenotípica e molecular da resistência
antimicrobiana e relação genética em isolados clínicos de
clones de alto risco de *Acinetobacter baumannii***

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de
2011)

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

Bueno, Mariana Sardinha
Caracterização fenotípica e molecular da
susceptibilidade antimicrobiana e relação genética em
isolados clínicos de clones de alto risco de
Acinetobacter baumannii / Mariana Sardinha Bueno. --
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.Assistência à saúde 2.Infecções
3.Resistência microbiana a medicamentos
4.Sequenciamento completo do genoma 5.*Acinetobacter*
baumannii 6.Clones de alto risco

USP/FM/DBD-132/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nivaldo e Maria Helena, e ao meu
irmão Felipe, pelo amor, incentivo e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelas graças concedidas, sabedoria, pelo crescimento interior e força diante de momentos difíceis. Sem Ele eu não estaria aqui e não seria absolutamente nada!

Aos meus pais, Nivaldo e Maria Helena, pelo amor, amizade, dedicação e carinho. Vocês são minha fonte de energia, coragem e inspiração. Se eu cheguei até aqui foi porque vocês me incentivaram e estiveram comigo em cada obstáculo da vida!

Ao meu irmão Felipe, pela amizade, cumplicidade, palavras de sabedoria e força. Pela conexão que temos um com o outro, acredito que ultrapassa laços genéticos, pois nossas almas estão totalmente interligadas. Contigo minha essência permanece eterna, obrigada por tudo!

Às minhas avós Maria Zita e Maria Melo, ambas *in memoriam*, pelo amor, pelo exemplo de vida e de fé, ensinamentos e por despertarem o melhor de mim. Agradeço a Deus por tê-las um dia em minha vida. Faço das palavras de Rubem Alves as minhas: “Aquilo que o coração ama fica eterno”.

Às amigas que fiz no Instituto Adolfo Lutz, Amanda Bertani, Carolina Pedace Carla Santos e Thays Barcellos, pela parceria, conselhos e momentos incríveis vividos juntas. Independente do caminho de cada uma, vocês se tornaram pessoas importantes na minha vida, quero levá-las sempre comigo!

Às minhas amigas Beatriz Rapoport, Camila Muniz, Gabrielle Borgomoni, Juliana Sardinha, Karla Vasques, Marcela Pinheiro, Soumaya Fares, Tawany Carvalho e Victoria Souza, pelo apoio mesmo com a distância, alegrias compartilhadas, consolo, mas sobretudo pela amizade de tantos anos.

Ao meu orientador Dr. Carlos Henrique Camargo, pela oportunidade, orientação e pelos conhecimentos transmitidos desde o Aprimoramento Profissional.

À Rosana Marques pela experiência compartilhada e pela possibilidade da descoberta do meu autoconhecimento.

À toda equipe de funcionários e alunos do Instituto Adolfo Lutz, pelo aprendizado, convivência, momentos alegres e conselhos, especialmente Ricardo Polatto, Sônia Regina, Doroti Garcia, Alex Reis e Filipe Nagamori.

Aos membros da banca de qualificação Dra. Denise Brandão, Dr. Rodrigo Cayô, pelas sugestões e contribuição para o enriquecimento desse trabalho e em especial Dra. Monique Tiba, pelo auxílio na montagem dos genomas.

Ao Pesquisador Dr. Enéas Carvalho, pela parceria em sequenciar os genomas dos isolados do estudo.

À Dra. Andrea Moreno e Dra. Luiza Moreno, pela parceria realizada com intuito de padronização do uso do MALDI-TOF nesse trabalho.

À equipe do laboratório de virologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo apoio e conselhos dados no final dessa etapa.

À secretaria de pós-graduação da Universidade de São Paulo (USP).

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pelo financiamento para que esse estudo fosse realizado, Processo FAPESP 2017/16988-6.

Às minhas professoras de Ballet, Eliana Marques, Regiane Gomes e Letícia Mesquita, que me recordaram que a dança é expressão de sentimentos e que tem efeitos terapêuticos em momentos desafiadores do dia a dia.

E por fim, mas não menos importante, a todos meus professores, desde a educação básica até a pós-graduação, pelo aprendizado. Vocês são um dos profissionais mais importantes do mundo!

EPIGRAFE

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses” (Rubem Alves)

RESUMO

Bueno MS. *Caracterização fenotípica e molecular da suscetibilidade antimicrobiana e relação genética em isolados clínicos de clones de alto risco de Acinetobacter baumannii* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam uma preocupação no mundo. Muitas destas infecções são ocasionadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, dentre os quais se destaca *Acinetobacter baumannii*. As infecções causadas por este patógeno eram tratadas com carbapenêmicos, porém diante da emergência e disseminação de cepas resistentes a estes antimicrobianos, outras opções terapêuticas tornam-se necessárias. Atualmente a disseminação de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos é relacionada a determinados clones de circulação mundial, como os Complexos Clonais CC1, CC2 e CC3. No Brasil, entretanto, há a prevalência do CC1, CC15 e CC79, denominados clones de alto risco. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade antimicrobiana e os determinantes genéticos de resistência em isolados clínicos de *A. baumannii* pertencentes ao CC1, CC15 e CC79, utilizando microdiluição em caldo e sequenciamento de genoma como principais metodologias. Foram estudados 63 isolados clínicos de *A. baumannii* de pulsotipos diferentes (*Apal*-PFGE), provenientes de 23 instituições brasileiras entre 2016 e 2017. Destes isolados, 21 (33,3%) pertenciam ao CC1, 20 (31,8%) ao CC15 e 22 (35%) ao CC79. A maior parte dos isolados foi classificada em XDR (extensivamente resistente) (CC1= 90,5%; CC15= 65%; CC79= 95,5%), sendo que o fenótipo PDR (pan-resistente) foi detectado em um isolado do CC15. Por meio do sequenciamento de genoma completo foi possível analisar a estrutura clonal dos isolados, categorizando-os nas sequências-tipo (ST) ST1, ST15, ST79, ST20, ST730 e ST1447 (ST novo). Além do MLST, os genes de resistência, sistemas de efluxo e mutações presentes nas cepas dos Complexos Clonais estudados foram caracterizados. Isolados pertencentes aos CC1 (100%) e CC15 (95%) apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}. Por outro lado, nos isolados do CC79, o gene *bla*_{OXA-23} foi detectado em 54,5% e *bla*_{OXA-72} em 50% dos isolados. Observou-se a presença de genes em comum aos isolados do CC1, CC15 e CC79, tais como *bla*_{OXA-23} e *aph*(3')-Vla. Entretanto, a comparação entre o perfil de suscetibilidade e a análise do genoma demonstrou dados relacionados aos diferentes Complexos Clonais, como *aac*(3)-Ia, *aac*(6')-Ib, *aac*(6)-Ib-cr, *sul1* para CC1 e *bla*_{OXA-72}, *bla*_{TEM-1A}, *dfrA1*, *sat2*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aadA1*, *msrE*, *mphE* e *floR* para CC79 ($p<0,05$). Dessa forma, nossa análise sugere que a seleção dos clones de alto risco seja impulsionada pelos determinantes de resistência sob pressão seletiva do uso de antimicrobianos.

Descritores: Assistência à saúde; Infecções; Resistência microbiana a medicamentos; Sequenciamento completo do genoma; *Acinetobacter baumannii*; Clones de alto risco.

ABSTRACT

Bueno MS. *Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial susceptibility and genetic relationship in clinical isolates of high-risk clones of Acinetobacter baumannii* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Healthcare associated infections (HAI) are a worldwide concern, many of these infections are caused by bacterial agents resistant to antimicrobials, among which the *Acinetobacter baumannii* stands out. Infections caused by this pathogen were treated with carbapenems, however, in view of the emergence and spread of strains resistant to these antimicrobials, other therapeutic options are necessary. Currently the dissemination of carbapenem-resistant *A. baumannii* is related to known clones of worldwide circulation, such as Clonal Complexes CC1, CC2 and CC3. In Brazil, however, there is a prevalence of CC1, CC15 and CC79, called high-risk clones. Thus, the present study aims to evaluate the antimicrobial susceptibility and the genetic determinants of resistance in clinical isolates of *A. baumannii* belonging to high risk-clones (CC1, CC15 and CC79), using broth microdilution and genome sequencing as main methodologies. 63 clinical *A. baumannii* isolates from different pulsotypes (Apal-PFGE), from 23 Brazilian institutions, between 2016 and 2017, were studied. Of these, 21 (33.3%) belonged to CC1, 20 (31.8%) to CC15 and 22 (35%) to CC79. The isolates were classified as XDR (extensively resistant) (CC1 = 90.5%; CC15 = 65%; CC79 = 95.5%), and the PDR (pan-resistant) phenotype was detected in an isolate from CC15. Through the complete genome sequencing, it was possible to analyze the clonal structure of the isolates, categorizing them in the sequencing type (ST) ST1, ST15, ST79, ST20, ST730 and ST1447 (new ST). In addition to MLST, resistance genes, efflux systems and mutations present in the strains of the studied Clonal Complexes were characterized. Isolates belonging to CC1 (100%) and CC15 (95%) presented the *bla*_{OXA-23} gene. On the other hand, in the CC79 isolates, the *bla*_{OXA-23} gene was detected in 54.5% and *bla*_{OXA-72} in 50% of the isolates. The presence of genes in common to isolates from CC1, CC15 and CC79 was observed, such as *bla*_{OXA-23} and *aph(3')-Via*. However, the comparison between the susceptibility profile and the genome analysis showed data related to the different Clonal Complexes, such as *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aac(6)-Ib-cr*, *sul1* for CC1 and *bla*_{OXA-72}, *bla*_{TEM-1A}, *dfrA1*, *sat2*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aadA1*, *msrE*, *mphE* and *floR* for CC79 ($p < 0,05$). Thus, our analysis suggests that the selection of high-risk clones is driven by the determinants of resistance under selective pressure of the use of antimicrobials.

Descriptors: Healthcare Associated; Infections; Drug resistance microbial; Whole genome sequencing; *Acinetobacter baumannii*; High risk clones.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Acetiltransferases
ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus- A. baumannii</i>
AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
ANT	Nucleotidiltransferases
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APH	Fosotransferases
ARI-1	<i>Acinetobacter resistant to imipenem</i>
AK	Amicacina
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo Clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CHDL	<i>Carbapenem-Hydrolyzing Class D β-lactamases</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COL	Colistina
CTC	Conselho Técnico Científico
CTX	Cefotaxima
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOR	Doripenem
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Cefepime

GEN	Gentamicina
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	International Clone
IMI	Imipenem
IMP	Imipenase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LEV	Levofloxacin
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MBL	Metalobetalactamase
MDR	Multirresistente
MEM	Meropenem
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MIN	Minociclina
m3LST PCR	<i>Trilocus sequence typing-based multiplex-PCR</i>
NDM	<i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	Pan-resistente
POL	Polimixina B
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
RNA	Ácido ribonucleico

SAM	Ampicilina-sulbactam
SNPs	<i>Single Nucleotide Polimorphisms</i>
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TIM	Ticarciclina-ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TZP	Piperacilina-tazobactam
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with mathematical averaging</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAP	<i>Ventilator-associated pneumonia</i>
VIM	<i>Verona Integron-encoded Metallo-betalactamase</i>
XDR	Extensivamente resistente

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de seleção de amostras de isolados de *A. baumannii* pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 39
- Figura 2.** Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC1 (n=21)45
- Figura 3.** Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC15 (n=20) 46
- Figura 4.** Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC (n=22). 47
- Figura 5.** Painel para leitura de acordo com formato da placa comercial de microdiluição em caldo (Sensititre, Thermo Scientific)..... 48
- Figura 6.** Distribuição do perfil de suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63). AK = amicacina, GEN = gentamicina, TOB = tobramicina, DOR = doripenem, IMI= imipenem, MEM = meropenem, CIP = ciprofloxacina, LEV = levofloxacina, TZP = piperacilina-tazobactam, TIM = ticarciclina-ácido clavulânico, CTX = cefotaxima, CAZ = ceftazidima, FEP = cefepime, SXT = sulfametoxazol-trimetoprim, SAM = ampicilina-sulbactam, COL = colistina, POL = polimixina B, DOX = doxiciclina, MIN = minociclina. S= sensível, I= intermediário, R= resistente56
- Figura 7.** Ilustração do perfil de suscetibilidade compilado aos dados genômicos encontrados nos clones de alto risco de *A. baumannii*.....75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de betalactamases propostas por Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (2010).....24

Quadro 2. Iniciadores e suas respectivas sequências utilizadas para determinação de oxacilinases em isolados de *A. baumannii* (Woodford et al., 2006; Higgins et al., 2010) 41

Quadro 3. Iniciadores e suas respectivas sequências para 3LST para *A. baumannii* (Martins et al., 2016) 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos isolados de <i>A. baumannii</i> conforme origem, estados e números de isolados.....	38
Tabela 2. Distribuição dos CC detectados por m3LST em isolados de <i>A. baumannii</i> recebidos no IAL, 2016 e 2017 (n=63)	55
Tabela 3. Distribuição de oxacilinases nos isolados de <i>A. baumannii</i> pertencentes aos CC1, CC15 e CC79, em isolados recebidos no IAL, no período de 2016 e 2017 (n=63)	56
Tabela 4. Determinação do percentual de resistência dos isolados pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 para os fármacos testados em placa comercial GNX3F – Gram Negative AST Plate with Colistin (n=63) [n (%)]	57
Tabela 5. Distribuição de isolados de <i>A. baumannii</i> sensíveis aos antimicrobianos colistina, polimixina B, doxiciclina, minociclina e tobramicina pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 (n=63)	58
Tabela 6. Perfil de suscetibilidade da cepa <i>A. baumannii</i> PDR, pertencente ao ST15 (CC15) (n=1).....	59
Tabela 7. Relação dos ST identificados por MLST (Esquema de Pasteur) e a distribuição da frequência dos isolados entre os ST encontrados entre os isolados de <i>A. baumannii</i> (n=63)	61
Tabela 8. Distribuição dos alelos do gene <i>blaOXA-51-like</i> em relação ao CC/ST de isolados de <i>A. baumannii</i> (n=63).....	62
Tabela 9. Distribuição do percentual dos genes de resistência presentes nos isolados de <i>A. baumannii</i> pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63)	63
Tabela 10. Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade e mutações encontradas em fluoroquinolonas nos clones de alto risco de <i>A. baumannii</i>	65
Tabela 11. Mutações encontradas nos genes <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> e <i>lpxD</i> e valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de polimixina B e colistina de isolados de <i>A. baumannii</i> pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 resistentes às polimixinas (n=7).	66

Tabela 12. Distribuição dos sistemas de efluxo presentes nos isolados de <i>A. baumannii</i> pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63).....	67
Tabela 13. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade, genoma de cepas intermediárias e resistentes às fluoroquinolonas.	70
Tabela 14. Frequência de resistências inferidas no genoma de cepas dos clones de alto risco de <i>A. baumannii</i> não suscetíveis a pelo menos um aminoglicosídeo, bem como categorias do perfil de suscetibilidade	71
Tabela 15. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade, genoma de cepas sensíveis e resistentes às tetraciclinas.....	73
Tabela 16. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade de sulfametoxazol-trimetoprim, genes de resistência e genoma de cepas sensíveis e resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	34
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Seleção de amostras.....	37
3.2	PCR multiplex para <i>A. baumannii</i> e Oxacilinas.....	39
3.3	Detecção dos grupos clonais por m3LST	41
3.4	Eletroforese de campo pulsado (PFGE)	42
3.4.1	Preparo das amostras.....	43
3.4.2	Digestão das amostras	44
3.4.3	Preparo de gel e eletroforese.....	44
3.5	Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana	47
3.5.1	Microdiluição em caldo	47
3.6	MALDI-TOF MS	50
3.7	Sequenciamento de genoma completo	51
3.7.1	Extração do DNA bacteriano	51
3.7.2	Preparo da biblioteca e corrida	52
4	RESULTADOS	54
4.1	Detecção das oxacilinas por PCR multiplex.....	55
4.2	Detecção dos Complexos Clonais por m3LST.....	55
4.3	Determinação do perfil de suscetibilidade por microdiluição em caldo.....	56
4.4	MALDI-TOF	61
4.5	Sequenciamento de genoma completo	62
5	DISCUSSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas um desafio para a saúde pública por destacarem-se pelos altos índices de morbidade, mortalidade e custos aos sistemas de saúde (ANVISA, 2017). Estas infecções anteriormente denominadas como infecções hospitalares, foram renomeadas como IRAS por não estarem restritas apenas a unidades hospitalares, independente de casos de indivíduos que estejam internados (Horan et al., 2008; Allegranzi et al., 2011).

O alto risco de mortalidade está associado a procedimentos invasivos, à gravidade da doença de base do paciente, ao sítio de infecção e à resistência aos antimicrobianos (Souza et al., 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de cada 100 pacientes hospitalizados, sete em países desenvolvidos e dez em países em desenvolvimento, adquirirão pelo menos um episódio de IRAS (WHO, 2014). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC), anualmente cerca de 1,7 milhões de pacientes que estão hospitalizados adquirem IRAS, e 98 mil vão a óbito devido a sua ocorrência (Haque et al., 2018).

Muitas destas infecções são ocasionadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., conhecidos como grupo ESKAPE. Especificamente no Brasil, os patógenos resistentes aos antimicrobianos apresentam proporções endêmicas (Rossi, 2011; Mulani et al., 2019).

Quando se trata de agentes causadores de IRAS resistentes aos antimicrobianos, podemos citar as espécies do gênero *Acinetobacter*, especialmente as que estão incluídas no Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Complexo ACB) (Peleg et al., 2008). De acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (2018), em São Paulo no período de 2005 a 2017, a taxa de resistência de *Acinetobacter* spp ao imipenem evoluiu de 20% para 84%, foi considerado o segundo patógeno causador de surtos de 2012 a 2017 no Brasil de acordo com dados da Anvisa (2018), e registrado na lista prioritária para produção de novos antimicrobianos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017).

Isolados de *Acinetobacter* foram descritos pela primeira vez em 1911 por Beijerinck, recuperadas do solo e designados como *Micrococcus calcoaceticus* (Dijkshoorn e Nemec, 2008; Doughari et al., 2011). Durante anos foram previamente classificados em gêneros distintos, como *Achromobacter* spp, *Alcaligenes* spp, *Cytophaga* spp, *Mucosus* spp, *Bacteria* spp, *Herellea vaginicola* spp, *lingelsheimia* spp, *Mimapolymorpha* spp, *Micrococcus* spp, *Moraxella* spp e *Neisseria* spp (Jung e Park, 2015).

Quanto à denominação do gênero, em 1954, Brisou e Prévot haviam proposto como *Acinetobacter* (do grego não móvel) para separar os microrganismos de acordo com a sua motilidade pertencentes ao gênero *Achromobacter*. Entretanto, somente em 1968, um estudo realizado por Baumann e colaboradores foi o que trouxe oficialmente esta nomeação (Lessel, 1971). *Acinetobacter* spp são caracterizados como cocobacilos (durante a fase de crescimento exponencial apresentam-se como bacilos e na fase estacionária como cocobacilos), gram-negativos, não-fermentadores da glicose, encapsulados, imóveis, aeróbios estritos, oxidase negativa e catalase-positivos (Perez et al., 2007; Peleg et al., 2008).

O gênero *Acinetobacter* spp compreende 78 espécies, entretanto as que são consideradas principalmente patogênicas aos seres humanos são as que estão incluídas no Complexo ACB, englobando *A. pittii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *Acinetobacter* 13TU, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae* e *A. baumannii* (Cosgaya et al., 2016, Gulen et al., 2015, Püntener-Simmen et. al, 2019), sendo indistinguíveis fenotipicamente. Dentre estas espécies, *A. baumannii* se destaca por interesse clínico, prevalência e capacidade de apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos (Peleg et al., 2008).

Esse patógeno pode ser encontrado no ambiente, em animais e em seres humanos (Jolly-Guillou, 2005). Pode permanecer em objetos inanimados em um período de até cinco meses (como nos ventiladores mecânicos e máquinas de diálise), além de sobreviver à dessecação, variabilidade de temperatura e soluções desinfetantes (Kramer et al., 2006; Wang e Qin, 2019).

Dentre as infecções mais frequentes ocasionadas por *A. baumannii* estão infecções de pele e de tecidos moles, infecções do trato urinário, meningites, pneumonias associadas aos sistemas de ventilação mecânica

(VAP) e infecções de corrente sanguínea (Peleg et al., 2008; Higgins et al., 2010). Essas infecções são mais frequentes em pacientes imunocomprometidos, portadores de dispositivos invasivos (como sondas e cateteres) e que estão internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Fortaleza et al., 2013). Em relação ao tratamento dessas infecções, torna-se dificultoso por haver resistência antimicrobiana pronunciada, o que o torna um fator alarmante no ambiente hospitalar, bem como na comunidade (Isler et al., 2019).

A. baumannii apresenta resistência intrínseca às aminopenicilinas, ao aztreonam, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, ao cloranfenicol e ao ertapenem (CLSI, 2018; Püntener-Simmen et al., 2019), e adquiridas a diversas classes de antimicrobianos (Bonomo e Szabo, 2006; Karageorgopoulos e Falagas, 2008). Existem diferentes mecanismos pelos quais um microrganismo se torna resistente a um determinado fármaco e a coexistência de mais de um mecanismo em um único isolado bacteriano contribui para a multirresistência (Rossi, 2011).

Antimicrobianos pertencentes a classes dos aminoglicosídeos, como amicacina, gentamicina, netilmicina e tobramicina, possuem atividade contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (MDR). Estes fármacos são considerados de amplo espectro, por serem utilizados em infecções por bactérias gram-positivas e gram-negativas (Sheikhalizadeh et al., 2017).

Em relação ao mecanismo de ação dos aminoglicosídeos, ligam-se ao RNA ribossômico 16S, induzindo uma mudança em sua conformação, ocasionando uma leitura errônea do RNA mensageiro, que resultará na inibição da síntese protéica (Azucena e Mabaskery, 2001; Becker e Cooper, 2013). Quanto à resistência a estes fármacos, pode ser mediada por perda da permeabilidade da membrana celular, expressão dos sistemas de efluxo ou especialmente por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) (Perez et al., 2007; Sheikhalizadeh et al., 2017), como as acetiltransferases (AAC), nucleotidiltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH) (Mingeot-Leclerq et al., 1999; Labby e Garneau-Tsodikova, 2013).

Essas enzimas são frequentemente codificadas por plasmídeo, o que facilita a rápida aquisição de um fenótipo de resistência entre espécies bacterianas (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Em relação aos genes codificadores de AMEs em *A. baumannii* circulantes no Brasil, estão os *aph(3')-VI*, *aph(3')-VIa*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa*, *aph(3'')-Ib/strA* e *aph(6)-Id/strB* (Aghazadeh et al., 2013; Polotto et al., 2019; Boettger et al., 2020).

Além de aminoglicosídeos, os antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, como ciprofloxacina e levofloxacina, por exemplo, também são empregados no tratamento de infecções bacterianas (Kakuta et al., 2020). Considerados fármacos de amplo espectro, as fluoroquinolonas têm como mecanismo de ação se ligar à DNA girase e à topoisomerase IV, inibindo-as, impedindo a transcrição e replicação do DNA bacteriano, tendo ação bactericida (Aldred et al., 2014).

Quanto à resistência antimicrobiana às fluoroquinolonas, podem haver mutações na DNA girase e topoisomerase IV, o que resulta em substituições de aminoácidos, alterando o sítio de ligação do fármaco, impedindo a ação do antimicrobiano. Na DNA girase essa mutação ocorre nos genes *gyrA* e *gyrB* e na topoisomerase nos genes *parC* e *parE*. Além de mutações na DNA girase e na topoisomerase IV, a diminuição da expressão de porinas na membrana externa bacteriana, hiperexpressão dos sistemas de efluxo (Aldred et al., 2014; Hooper e Jacoby, 2016), e resistência mediada por plasmídeo (PMQR), também podem ser outros mecanismos de resistência às fluoroquinolonas (Yang et al 2016; Kimura et al., 2018; Yassine et al., 2019). De acordo com Yang e colaboradores (2016), a presença dos determinantes codificados pelos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qepA*, *aac(6')/Ib-cr* pode contribuir para altos níveis da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de levofloxacina e ciprofloxacina em *A. baumannii*.

Diante da crescente resistência antimicrobiana em *A. baumannii* ao longo dos anos, tornaram-se necessárias outras opções terapêuticas para infecções por este patógeno, como por exemplo, o uso de tetraciclina e polimixinas (Lashinky et al., 2017; Kon et al., 2020). A classe das tetraciclina atua na subunidade 30S do ribossomo, impedindo a ligação de aminoacil-t-RNA, e consequente a adição de aminoácidos, fazendo

com que não haja a síntese proteica. São exemplos de tetraciclinas: minociclina, tetraciclina e doxiciclina.

Quanto ao mecanismo de resistência, por exemplo, podemos citar o efluxo do fármaco. Neste caso, as proteínas transmembranares (Tet), exportam o antimicrobiano para fora da célula bacteriana, o que resulta em uma menor concentração intracelular do antimicrobiano (Maia et al., 2010). De acordo com Vila e colaboradores (2007) e Wang e colaboradores (2017), em *A. baumannii*, Tet (A) e Tet (B) são os principais sistemas de efluxo quanto ao mecanismo de resistência associado a esta classe. Entretanto, também há registros na literatura os quais relatam que a alteração de porinas pode atuar como um papel significativo nos mecanismos de resistência, como a OmpF, que limita a difusão do antimicrobiano para a zona periplasmática das bactérias gram-negativas (Speer et al., 1991).

Em relação às polimixinas, as quais compreendem os antimicrobianos polimixina B e colistina (polimixina E), por terem carga positiva, ligam-se aos grupos fosfatos (que possuem carga negativa) dos lipídeos presentes na membrana citoplasmática dos microrganismos gram-negativos, ocasionando o deslocamento de cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} . Com isso há desestabilização do lipopolissacarídeo (LPS), alterando a permeabilidade da membrana plasmática, fazendo com que ocorra o vazamento do conteúdo citoplasmático e consequentemente a morte celular (Ezadi et al., 2019).

Estes fármacos foram utilizados no tratamento de infecções por bactérias gram-negativas desde sua descoberta, em 1947, todavia, na década de 1980, foram banidos da terapêutica devido à presença de eventos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Mendes e Burdmann, 2009). Devido a altas taxas de resistência aos demais antibióticos, houveram ajustes da dose terapêutica das polimixinas, na tentativa de melhorar a toxicidade (Velkov et al., 2010). Com isso, esta classe passou a ser considerada novamente uma opção terapêutica de infecções por *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Zavascki et al., 2007; Ezadi et al., 2019).

Os mecanismos de resistência às polimixinas podem ser relacionados com alteração na estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias gram-negativas. Os sistemas regulatórios da

expressão da maioria dos genes que modificam o LPS são chamados de sistemas de dois componentes, como PmrA-PmrB (Moffatt et al., 2019). Segundo Ezadi e colaboradores (2019), a resistência em *A. baumannii* é principalmente devido à presença de mutações nos genes *pmrA* e *pmrB*, em que *pmrB* é um sensor quinase localizado na membrana que fosforila e ativa *pmrA*, regulador da resposta do sistema de dois componentes (Beceiro et al., 2011; Olaitan et al., 2014; Chin et al., 2015).

A. baumannii também pode sofrer mutações nos genes da biossíntese lipídica *A*, *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, fazendo com que não ocorra a produção de LPS (Caniaux et al., 2016; Poirel et al., 2017; Moffatt et al., 2019). Além destes mecanismos, foi detectado o gene *mcr* (*mobilized colistin resistance*) (Liu et al., 2015), que confere resistência plasmidial às polimixinas, como o *mcr-1* e *mcr-4* em isolados de *A. baumannii* (Gelbíčová et al., 2019; Hameed et al., 2019; Ma et al., 2019; Martins-Sorenson et al., 2020).

Apesar das diversas opções de antimicrobianos para tratamento de infecções por microrganismos gram-negativos, a classe dos betalactâmicos é uma das mais utilizadas por possuir boa eficácia, baixa toxicidade e ampla margem terapêutica. Atuam na parede celular, tendo a capacidade de inibir a última fase da síntese da mesma, possuindo efeito bactericida (Possebon e Camargo, 2003). No entanto, o uso destes antimicrobianos pode ser restrito devido ao aumento nas taxas de resistência reportadas (Suárez e Gudíol, 2009), que envolvem mecanismos de resistência como a presença de sistemas de efluxo, perda de porinas e produção de enzimas betalactamases (Livermore e Woodford, 2006).

Em relação aos sistemas de efluxo, são categorizados em cinco famílias: MFS (*major facilitator family*), SMR (*small multidrug resistance*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), ABC (*adenosine triphosphate binding cassette*) e RND (*resistance-nodulation-division*). As que estão relacionadas à resistência em *A. baumannii* são as classes RND e MFS com maior frequência, seguidas de ABC (Wieczorek et al., 2008; Blair et al., 2015).

O mecanismo de resistência aos betalactâmicos mais frequente em bactérias gram-negativas é a produção de betalactamases, que hidrolisam o

anel betalactâmico, resultando na ineficácia do antimicrobiano, fazendo com que não haja a síntese da parede celular bacteriana (Bush e Bradford, 2020).

Foram propostas classificações para estas enzimas de acordo com suas características estruturais, sendo divididas em quatro classes moleculares (A, B, C e D) que se relacionam com grupos (1-3) de acordo com sua classificação funcional (Quadro 1) (Bush e Jacoby, 2010; Bush e Bradford, 2020).

Quadro 1. Classificação geral de betalactamases propostas por Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (2010).

Classe molecular (Ambler, 1980)	Classificação funcional (Bush, Jacoby e Medeiros, 2010)		Substrato	Exemplos
	Grupo Funcional	Subgrupo		
A	2	2a	Penicilina	PC1
		2b	Penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	TEM-1, TEM-2, SHV-1
		2be	Cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	ESBL (CTXM-15, PER-1, SHV-2, TEM-3 etc)
		2br	Penicilina	TEM-30, SHV-10
		2ber	Cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	TEM-50
		2c	Carbenecilina	PSE-1, CARB-3
		2ce	Carbenecilina e cefepime	RTG-4
B	3	3a	Carbapenêmicos	IMP, VIM, SPM, IND, NDM
		3b	Carbapenêmicos	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ1, CphA, Sfh1
C	1	-	Cefalosporinas	AmpC (ACT-1, CMY-2, FOX, MIR-1 etc)
		2d	Oxacilina de espectro restrito	OXA-1, OXA-10

D	2	2de	Oxacilina e cefalosporinas de amplo espectro	OXA-11, OXA-15
		2df	Oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-253, OXA-72, OXA-231, OXA-235 etc

Em espécies de *Acinetobacter* spp, as principais betalactamases que podem apresentar efeito de carbapenemases (*Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -lactamases* - CHDL) são as oxacilinases da classe D de Ambler, que são divididas em seis subgrupos principais OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like (Evans e Amyes, 2014; Pournaras et al., 2014; Yoon e Jeong, 2020). Além disso também pode haver a produção de metalobetalactamases (MBL), como NDM, IMP, VIM, porém em menor frequência (Poirel e Nordmann, 2006; Rodríguez et al., 2018).

Para identificação das oxacilinasas presentes em cepas de *A.baumannii* é utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR multiplex), uma vez que não há métodos fenotípicos para detecção destas enzimas. Este método consiste na amplificação de uma sequência genética alvo através de iniciadores, os quais são possíveis detectar as oxacilinasas OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-51-like, OXA-143-like e OXA-235-like (Woodford et al., 2006; Higgins et al., 2010).

Em relação à descoberta das oxacilinasas, em 1996, a enzima OXA-51 foi encontrada na Argentina (Brown et al., 2005). Este grupo é intrínseco em *A. baumannii* (Merkier e Centrón, 2006; Turton et al., 2006), o que leva a identificação da espécie. Porém, foi relatada a presença do gene *bla*_{OXA-51-like}, em outras espécies do gênero *Acinetobacter*, como em *A. nosocomialis* e em *A. pittii*, afetando a diferenciação da espécie (Lee et al., 2012; Saranathan et al., 2014). Assim, se faz necessário o uso de outras metodologias complementares para identificação de *A. baumannii* (Lee et al., 2009; Lee et al., 2012; Teixeira et al., 2013; Saranathan et al., 2014). Um estudo recente de Takebayashi e colaboradores (2021) mostra que variantes de OXA-51, como OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-69, OXA-82, OXA-83, OXA-107, OXA-110 e OXA-111, precisam da hiperexpressão de uma sequência de inserção (IS) e a presença de substituições de aminoácidos no sítio ativo dos carbapenêmicos para conferir resistência a esse antimicrobiano. Além disso, existem variantes que se associam a linhagens epidêmicas, como por exemplo OXA-66 ao IC2, OXA-69 ao IC1 e OXA-71 ao IC3, clones de circulação mundial, que favorecem a disseminação de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (Evans et al., 2008; Diancourt et al., 2010; Pournaras et al., 2014).

Já em 1985, na cidade de Edimburgo (Escócia, Reino Unido) foi descrita a enzima OXA-23, inicialmente denominada como ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*), sendo a primeira oxacilinase relatada em *A. baumannii* a conferir resistência ao imipenem (Paton et al., 1993). A partir da identificação de outros tipos de OXA resistentes a carbapenêmicos, com similaridade estrutural à OXA-23 foi originado o grupo OXA-23-like (Hornstein et al., 1997; Vila et al., 1997).

Na América Latina, as enzimas do grupo OXA-23 foram as primeiras descritas e são consideradas as mais prevalentes e disseminadas mundialmente (Rodríguez et al., 2018), incluindo o Brasil, sendo detectada pela primeira vez em 1999 em Curitiba, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais (Dalla-Costa et al., 2003). Foi também detectada em isolados de efluentes hospitalares em Porto Alegre e em rios urbanos do estado de São Paulo, gerando uma preocupação para saúde pública pela possibilidade de cepas hospitalares se propagarem ao meio ambiente (Medeiros e Lincopan, 2013; Rocha et al., 2017).

Em 1997, foi descrita a enzima OXA-24, em isolados de um surto de *A. baumannii* na Espanha. Esta enzima é frequentemente encontrada em países do continente europeu, como Portugal, Espanha e Bélgica. Posteriormente, essa mesma oxacilinase foi erroneamente classificada como uma nova variante, OXA-40. Ainda que tenha sido encontrada inicialmente neste patógeno, foi reportada também em plasmídeos de outras espécies de *Acinetobacter*, em *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Evans e Amyes, 2014). No Brasil a OXA-24/40 é menos frequente, porém a variante OXA-72, identificada inicialmente na Tailândia em 2004, apresenta uma importância crescente na América Latina, encontrada nos últimos anos no Equador (Nuñez Quezada et al., 2017), no Peru (Levy-Blitchtein et al., 2018) e no Brasil, com potencial disseminação entre diferentes centros (Vasconcelos et al., 2017). Registra-se sua ocorrência nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Paraná (Werneck et al., 2011; de Sá Cavalcanti et al., 2013; Martins e Barth, 2013; Carvalho et al., 2015; Vasconcelos et al., 2015; Pagano et al., 2017). Em contexto global já foi encontrada na China, Coreia do Sul, Taiwan, Itália, Espanha e França (Poirel

et al., 2010; Di Popolo et al., 2011; Candel et al., 2010; Barnaud et al., 2010; Werneck et al., 2011).

Os isolados de *A. baumannii* podem ainda ser carreadores de OXA-58, isolada primeiramente na França, em 2003 e encontrada posteriormente no Kuwait, Inglaterra, Europa, China, Austrália, Paquistão, Tunísia, Estados Unidos, Bolívia, Argentina e até mesmo no Brasil, onde foi detectada no ano de 2010 em São Paulo e em 2011 no Rio de Janeiro (Poirel et al., 2005; Peleg et al., 2008; Sevillano et al., 2012; Wu et al., 2015; Mathlouthi et al., 2018). Foi detectada ainda em isolados de *A. seifertii* provenientes de dois pacientes em São Paulo hospitalizados na década de 1990 (Cayô et al., 2016), e em 2012 detectada em um zoológico em São Paulo, isolada de um cisne de pescoço negro (Narciso et al., 2017).

Enzimas que parecem estar principalmente restritas ao Brasil são do grupo OXA-143, identificadas em plasmídeos, mas com casos esporádicos na Coreia do Sul, em Honduras e nos Estados Unidos (Evans e Amyes, 2014; Zander et al., 2014), e Irã em 2017 (Sarikhani et al., 2017). No Brasil foi identificada pela primeira vez em São Paulo, em 2004 (Higgins et al., 2010; Antonio et al., 2011; Mostachio et al., 2012), e a sua variante OXA-231, pode ser detectada em ambientes hospitalares brasileiros como no Paraná, em São Paulo (Gionco et al., 2012; Camargo et al., 2016), no Rio de Janeiro (Werneck et al., 2011), Minas Gerais (Medeiros e Lincopan, 2013) e a OXA-253 em Belo Horizonte (Girlich et al., 2014) e em Recife (de Sá Cavalcanti et al., 2013).

As que são encontradas no Brasil, além de OXA-51-like (enzima intrínseca em *A. baumannii*, renomeada de OXAAb segundo Nigro e Hall, 2018) são OXA-23-like, OXA-72, OXA-143 e OXA-231, difundidas em diferentes estados brasileiros. Mas o que tem se observado é que a disseminação de cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos é atualmente vista como limitada a determinados clones de circulação mundial (Diancourt et al., 2010).

Historicamente, três linhagens clonais compunham a estrutura de isolados clínicos de *A. baumannii*, identificados como clones europeus 1, 2 e 3. Entretanto, foi visto que esses clones eram disseminados mundialmente, sendo denominados posteriormente como Clone Internacional I (IC1), Clone Internacional II (IC2) e Clone Internacional III (IC3). Estudos conduzidos principalmente na Europa identificaram estes clones como predominantes, e correspondentes aos complexos clonais CC1, CC2 e CC3 de acordo com o esquema de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) do Instituto Pasteur (Woodford et al., 2011). Entretanto, com o passar dos anos e a pesquisa dos clones em outras localidades, essa distribuição pareceu ser mais homogênea nos isolados europeus, já que em determinadas regiões, há predomínio de outras linhagens que não são as do IC1, IC2 e IC3 (Grosso et al., 2010; Chagas et al., 2014).

No Brasil, por exemplo, o IC2 foi relatado no período de 1999 a 2003, porém desapareceu no ano seguinte (Martins et al., 2013). E detectado novamente na região sul do Brasil entre 2013 e 2014 (Pagano et al., 2019). Nos últimos anos é documentada a prevalência do IC1 (CC1), mas não do IC2, e IC3, que foram apenas detectados em estudos mais pontuais como no Peru, no qual foi reportado o surgimento de isolados pertencentes ao IC2, e o primeiro caso de IC3 na América Latina (Pagano et al., 2017; Levy-Blitchtein et al., 2018; Pagano et al., 2019). Além desses clones, há relatos do aparecimento do IC7 (CC25), em menores proporções, em países como Paraguai, Argentina, Bolívia e Brasil (Chagas et al., 2014; Cerezales et al., 2019; Nodari et al., 2020).

No Brasil, juntamente com o IC1, há prevalência dos CC15 e CC79 (Vasconcelos et al., 2015; Camargo et al., 2016; Martins et al., 2016; de Azevedo et al., 2019; Tavares et al., 2019), conhecidos como clones de alto risco (Medeiros e Lincopan, 2013).

Preocupantemente, esses CC circulantes em nosso meio apresentam pronunciados níveis de resistência a outros antimicrobianos, além dos carbapenêmicos (Vasconcellos et al., 2017b). Os CC1, CC15 e CC79 estão presentes em isolados clínicos das cinco regiões brasileiras, além de outras fontes, como efluentes hospitalares, rios urbanos e até mesmo em aves migratórias, como foi o caso do CC79 (Grosso et al., 2010; Medeiros e Lincopan, 2013; Chagas et al., 2014; Narciso et al., 2020).

Em relação à epidemiologia dos clones de alto risco de *A. baumannii*, o CC15, foi identificado em países como Itália, Espanha, Grécia, Turquia, Noruega, Portugal, República Checa, Holanda, Argentina e Brasil, e o CC79 em países da América Latina, nos Estados Unidos e na Espanha (Villalón et al., 2011; Mosqueda et al., 2013; Kanamori et al., 2016). No Brasil os clones de alto risco já foram encontrados no Rio de Janeiro (Grosso et al., 2010; Martins et al., 2013), São Paulo, Minas Gerais (Clímaco et al., 2013), Bahia (Coelho-Souza et al., 2013), Alagoas, Rio Grande do Norte, Brasília, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pará (Chagas et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015; Camargo et al., 2016).

De acordo com estudos recentes, o CC79 é considerado o complexo clonal mais disseminado em nosso país (de Azevedo et al., 2019; Tavares et al., 2019). Em um estudo realizado por da Silva e colaboradores (2018), mostrou que o ST79 (CC79) foi o ST detectado com frequência em um hospital de ensino do Mato Grosso e revelou que os pacientes infectados com isolados de *A. baumannii* pertencentes a esse complexo clonal

apresentaram uma maior taxa de mortalidade em comparação às outras cepas. Dados semelhantes também foram publicados por de Azevedo e colaboradores (2018), o qual houve predominância do ST730 (CC79) e maior taxa de mortalidade quando comparado aos outros STs encontrados no estudo.

Quanto à identificação dos clones de alto risco, depende da identificação do tipo de sequência (ST) gerado pela análise de MLST (*Multilocus Sequence Typing*). O MLST foi proposto em 1998 e atualmente é aplicável a diversos patógenos. Para *A. baumannii* há dois esquemas de MLST, o de Bartual (Oxford) e do Instituto Pasteur (esquema de Pasteur), ambos trabalham com sete genes constitutivos e três genes em comum *gltA*, *recA* e *cpn60* (Bartual et al., 2005).

De acordo com dados da literatura, o esquema de Pasteur apresenta melhor desempenho ao identificar as linhagens clonais, pelos genes envolvidos estarem presentes em ambas metades do cromossomo de *A. baumannii* (Tomaschek et al., 2016; Gaiarsa et al., 2020). Entretanto, para discriminar isolados correspondentes ao IC2, o protocolo de Oxford é recomendado, devido à alta variabilidade dos genes *gpi* e *gyrB*, analisados somente nesse esquema (Tomaschek et al., 2016).

A metodologia de MLST trata-se de uma técnica laboriosa, de alto custo e dificilmente aplicável a laboratórios com recursos limitados, por depender de sequenciamento de sete genes constitutivos (Persing et al., 2016). Diante deste contexto, Turton e colaboradores (2007) desenvolveram uma PCR multiplex para detectar IC1, IC2, IC3, de isolados de *A. baumannii* provenientes de um surto do Reino Unido.

Essa metodologia não é capaz de identificar os principais complexos clonais circulantes no Brasil, por isso Martins e colaboradores (2016) desenvolveram uma nova abordagem, denominada de m3LST PCR (*trilocus sequence typing-based multiplex-PCR*) com resultados satisfatórios em utilização posterior (Vasconcellos et al., 2017a).

Esse método é baseado na amplificação dos genes de formação de biofilme (*csuE*), de proteína de membrana externa A (*ompA*) e do gene codificador de OXA-51-like (*bla_{OXA51-like}*), que dispensa a etapa de sequenciamento. Por sua vez, permite a caracterização de isolados de *A. baumannii* nos complexos clonais CC1, CC2, CC15, CC25 e CC79, identificando, portanto, os clones de alto risco circulantes no Brasil.

A inclusão de um novo perfil permitiu identificar ainda mais um ST, o ST317, que parece ser restrito aos isolados brasileiros, aumentando as possibilidades do m3LST em nosso cenário epidemiológico (Tavares et al., 2018).

Já com a finalidade de detectar surtos em ambientes hospitalares, avaliar a relação genética entre as cepas e subtipagem de patógenos, é utilizada a metodologia de Eletroforese em campo pulsado (PFGE). O PFGE é reconhecido como um dos métodos com alto poder discriminatório, por usar o DNA cromossômico total (Magalhães et al., 2005; Melles et al., 2007; Towner et al., 2008). O DNA total é incorporado em bloco de agarose, o qual é digerido com enzima de restrição que cliva o cromossomo em grandes fragmentos. Estes fragmentos são separados por eletroforese de campo pulsado, o qual seu campo elétrico altera direções e intensidade, que permite a separação de moléculas de DNA maiores que 12 Mb (Dijkshoorn et al., 2001; CDC, 2016).

Além destes métodos de tipagem, consagrados pelo uso e aplicabilidade, podem ser utilizados para detecção e para estudo epidemiológico de *A. baumannii* outros métodos ainda exploratórios. Dentre eles destacam-se com potencial utilização as técnicas de Espectrofotometria de massa (MALDI-TOF MS). Trata-se de uma metodologia, na qual o material é colocado em uma placa com matriz e atingido com um laser que o evapora. Um sistema ioniza e aspira o material volatilizado, no qual é registrado o tempo em que a substância chega ao detector e sua quantidade. De uma forma geral, este método identifica as espécies microbianas, rapidamente (em menos de cinco minutos por amostra), além de poder permitir a detecção de resistência e virulência quando há a produção de picos específicos de proteína (Espinal et al., 2012; Pasternak, 2012).

Segundo Cabrol e colaboradores (2015), este método também permite detectar os possíveis clones circulantes, como já foi descrito para *P. aeruginosa*. Porém para *Acinetobacter* os resultados são controversos, como no estudo de Mencacci e colaboradores (2013), o qual agrupou IC1, IC2 e IC3 por ribotipagem com MALDI-TOF-MS, enquanto que Sousa e colaboradores (2015) demonstraram resultados insuficientes quanto à discriminação de complexos clonais de *A. baumannii*. Sugere-se a realização de mais estudos para fornecer mais informações sobre o uso dessa metodologia com o objetivo de discriminar isolados a nível clonal (Sousa et al., 2015).

Outra tecnologia com elevado potencial e de crescente utilização é o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*). Embora apresente alto custo e análise complexa, devido à necessidade de softwares específicos, fornece informações completas dos genomas bacterianos, como a virulência (viruloma), resistência (resistoma), plasmídeos (plasmidoma), além de aspectos microevolutivos, filogenéticos e os STs dos isolados (Dunne et al., 2012).

Existem plataformas para gerar os dados de NGS bacteriano como Ion Torrent, Illumina, PacBio e MinION (Buermans e Dunnen, 2014). Cada uma destas tecnologias apresenta limitações e custos diferenciados, mas a metodologia Illumina é a que tem mais sido utilizada pelo nível de erro baixo e por ter sido a plataforma empregada por redes de monitoramento global, como a Rede PulseNet (Salipante et al., 2015).

Pelo sequenciamento de nova geração é possível ainda gerar outros tipos de dados para tipagem molecular, como a detecção de polimorfismos em nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) (Lewis et al., 2010; Li et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2016; Rossen et al., 2017). Em *Acinetobacter* spp, um patógeno capaz de apresentar diversificados mecanismos de resistência, a estrutura genômica da resistência (resistoma) pode ser identificada usando a tecnologia de NGS (Lewis et al., 2010), e a correlação entre os achados genômicos e fenotípicos poderão subsidiar a implantação desta tecnologia para predição da resistência *in vitro* (McDermott et al., 2016; Day et al., 2017; Sadouki et al., 2017).

Considerando a disseminação de isolados de *A. baumannii* resistentes aos antimicrobianos ao longo dos anos, há escassez de dados da estrutura genômica dos CC1, CC15 e CC79. A elucidação desses complexos clonais poderá sugerir fatores do seu sucesso em instituições brasileiras, bem como correlacionar com o perfil de suscetibilidade apresentado.

2 OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade antimicrobiana, a relação genética e os determinantes de resistência em isolados clínicos de *A. baumannii* pertencentes aos clones de alto risco CC1, CC15 e CC79, no período de 2016 a 2017.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar os genes de oxacilinases presentes;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade dos clones de alto risco (CC1, CC15 e CC79) aos antimicrobianos;
- Avaliar o uso de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) para identificação dos clones de alto risco;
- Esclarecer através do sequenciamento de genoma completo a estrutura genômica dos clones de alto risco;
- Correlacionar os dados obtidos através do sequenciamento de genoma completo, a suscetibilidade aos antimicrobianos e o perfil proteico gerado por MALDI-TOF MS entre os clones de alto risco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de amostras

No período de 2016 e 2017, 134 isolados identificados como *Acinetobacter* spp., provenientes de 23 instituições brasileiras de saúde pertencentes aos estados de São Paulo, Espírito Santo, Pernambuco, Sergipe e Minas Gerais, foram enviados ao Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) para identificação confirmatória e caracterização da sensibilidade antimicrobiana, conforme estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde Nº 3.120, de 17 de dezembro de 2013. Estes isolados foram provenientes de sangue, secreção traqueal, urina, líquido, lavado broncoalveolar, secreção abdominal, swab retal, membro inferior, ponta de cateter, secreção anal, swab úlcera (Tabela 1).

Com a finalidade de selecionar isolados representativos de pulsotipos diferentes dentro dos complexos clonais de *A. baumannii*, foi utilizada a metodologia de PFGE como triagem das amostras, sendo totalizados 94 isolados. Destes isolados, 34 foram excluídos deste trabalho, pois não pertenciam aos CC1, CC15 e CC79. Desta forma, 63 isolados foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), MALDI-TOF MS e sequenciamento de genoma completo (Figura 2).

O presente estudo encontra-se aprovado na Plataforma Brasil, número CAAE 23482719.5.0000.0059 e no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL), parecer CTC 07-K/2018.

Tabela 1. Distribuição dos isolados de *A. baumannii* conforme origem, estados e percentual de isolados (n=63).

Sítio de isolamento	Localidades	Percentual de isolados
Sangue	São Paulo	19
	Botucatu	8
	Piracicaba	1,6
	Presidente Prudente	1,6
	Sergipe	1,6
Secreção traqueal	São Paulo	4,7

	Assis	3
	Presidente Prudente	17
	Minas Gerais	1,6
Urina	São Paulo	8
	Presidente Prudente	4,8
	Vitória	1,6
	Recife	1,6
	Aracaju	1,6
Líquor	São Paulo	3,2
	Rio Claro	1,6
	Sorocaba	1,6
Lavado broncoalveolar	São Paulo	3,2
Secreção abdominal	Vitória	1,6
Swab retal	Presidente Prudente	1,6
Incisão cirúrgica	Piracicaba	1,6
	Presidente Prudente	1,6
Membro inferior	São Paulo	1,6
Ponta de cateter	São Paulo	1,6
Secreção anal	São Paulo	1,6
Swab de úlcera	Presidente Prudente	1,6
Secreção ocular	São Paulo	1,6

Figura 2. Fluxograma de seleção de amostras de isolados de *A. baumannii* pertencentes aos CC1, CC15 e CC79.

3.2 PCR multiplex para *A. baumannii* e Oxacilinases

Para identificação presuntiva de *A. baumannii* (detecção do gene *bla*_{OXA-51-like}) e detecção das oxacilinases presentes, os isolados foram submetidos à reação da cadeia em polimerase multiplexada (PCR multiplex) para os genes *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} (Quadro 2). O DNA foi extraído por lise térmica, três colônias isoladas em 1 mL de água ultrapura estéril em um microtubo estéril de volume 1,5 mL (Eppendorf), homogeneizados em vórtex (Labnet), aquecidos posteriormente a 95°C por 10 minutos em termobloco (Accublock Digital Dry Bath, Labnet) e centrifugados a 4°C por 10 minutos a 12000 rpm. Após este processo, transferiu-se o sobrenadante a um novo microtubo e estocado a -20°C.

Foi realizada a PCR de cada amostra com volume final da reação de 20 μL , incluindo 5 μL de água Milli-Q estéril, 0,4 μL de cada iniciador específico na concentração de 10 μM (estes em concentrações finais 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 corrida: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos (94°C/25 seg, 52°C/40 seg, 72°C/50 seg), 72°C por 6 minutos. As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose (Agarose LE, EasyPath) a 1,5% e realizada a eletroforese a 100 V, por 40 minutos. Este gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob o auxílio de luz ultravioleta em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems).

Quadro 2. Iniciadores e suas respectivas sequências utilizadas para determinação de oxacilinases em isolados de *A. baumannii* (Woodford et al., 2006; Higgins et al., 2010).

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

3.3 Detecção dos grupos clonais por m3LST

Foi realizada a metodologia m3LST, uma PCR multiplex para determinar os grupos clonais presuntivos dos isolados de acordo com o protocolo de Martins e colaboradores (2016). Esta reação possui o volume final de 20 µL, com 3,2 de água Milli-Q estéril, 10 µL de Mix 2x concentrado (Promega), 0,6 µL de cada iniciador (ompA-FM, ompA-RM, omp-RBM, csuE-FM, csuE-FBM, csuE-RM, OXA-51-FM, OXA-51-RM) (Sigma) na concentração de 10 µM e 1,0 µL de DNA (Quadro 3). Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti 96- Well Thermal Cyclor, Applied BioSystems), seguindo os parâmetros de corrida (95°C por 3 minutos, 25 ciclos (95°C/1 min, 57°C/30 seg, 72°C/30 seg), 72°C por 3 minutos), quando amplificados foram aplicados em gel de agarose (Agarose LE, EasyPath) a 1,5% e a eletroforese foi realizada a 100V, por 40 minutos. Este gel foi corado

com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) com luz ultravioleta. Para o auxílio da interpretação dos resultados foram utilizados os controles IC1 (CC1), IC2 (CC2), IC3 (CC15), Acb48 (correspondente ao CC79) e Acb14 (correspondente ao CC25), e de acordo com seus perfis de bandas foi possível identificar presuntivamente cada isolado de acordo com seu complexo clonal.

Quadro 3. Iniciadores e suas respectivas sequências para 3LST para *A. baumannii* (Martins et al., 2016).

Gene	Sequência (5' - 3')
<i>ompA</i>	ompA-FM:TGGCGGTAAAGATGGTAAC ompA-RM:CCTAAAGTACCTTCTTCTGAGTTAC ompA-RBM:TTCCAGAACTCTCATCAGC
<i>csuE</i>	csuE-FM: CGATTGTGGGAATCGGTGCC csuE-FBM:TTGGCGAACATGACCTATT csuE-RM:CACATAATATGGTGTATTTACCGAA
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-FM: AGTATTTAAGTGGGACGGGC OXA-51-RM:CGACGAGCTAAATCTTGATAAACC

3.4 Eletroforese de campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi utilizada como método de triagem dos isolados, com a finalidade de trabalhar com pulsotipos diferentes dentro dos Complexos Clonais 1, 15 e 79 de *A. baumannii*, com o protocolo padronizado por Seifert e colaboradores (2005).

3.4.1 Preparo das amostras

Os isolados bacterianos foram semeados em meio TSA (Tryptic Soy Agar) e incubados a 30°C por 20 a 24 horas. Com este crescimento recente, inicialmente, foi preparada uma suspensão bacteriana ajustada a aproximadamente 10^9 células/mL em Tampão de Suspensão Celular (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0), com turbidez de 15% de transmitância medido em espectrofotômetro. Foi aliqotado 200 μ L desta suspensão e transferida para microtubo de centrífuga de 1,5 mL e incubada por 10 minutos a 55°C. Foi acrescentado a este tubo 10 μ L de proteinase K (solução 20 mg/mL) e 5 μ L de lisozima (solução de 40 mg/mL) e homogeneizados.

A seguir, foram adicionados 200 μ L de agarose SeaKem Gold já fundida e estabilizada, para preparo de plugues, à concentração de 1% em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). A suspensão de células em agarose foi desta forma distribuída em moldes para plugues, deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e em geladeira por mais 5 minutos para completa solidificação. A seguir, os plugues foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris, 50mM EDTA [pH 8;0], 1% sarcosil) com 25 μ L de proteinase K (solução 20 mg/mL) e incubados a 55°C por 2 horas sob agitação constante (150 a 200 rpm). Após a lise, o tampão foi removido e nos tubos Falcon foram acrescentados 10 mL de água ultrapura pré-aquecida a 55°C e incubados a 55°C em agitador (150 a 200 rpm) por 15 minutos, repetindo todo este processo por mais três vezes.

Posteriormente a lavagem foi realizada com tampão TE pré-aquecido a 55°C, por quatro vezes, sob incubação de 55°C, e agitação constante (150-200 rpm). Após a realização destas lavagens, foi adicionado 10 mL de TE à temperatura ambiente e os plugues foram estocados a 4°C.

3.4.2 Digestão das amostras

Com uma lamínula os plugues foram cortados, com largura aproximada de 2 mm, submetidos à digestão com 30 U da enzima *ApaI* (Promega) (concentração final/ bloco de agarose), em 100 mL de solução (Buffer, BSA, enzima *ApaI* e água) e incubados por 16-18h em banho-maria a 37°C.

3.4.3 Preparo de gel e eletroforese

Os plugues com DNA digerido foram aplicados em um gel de agarose *SeaKem Gold* à concentração de 1%, em TBE 0,5X (40 mM Tris-HCl, pH 8,3, 45mM ácido bórico e 1mM EDTA). Foi utilizado como marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs) em três linhas de cada gel (nos poços 1, 5 e 10). O gel de agarose foi deixado à 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, nos parâmetros:

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

Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos com solução de brometo de etídio 1 µg/mL, e descorado em água destilada em três lavagens de 15 minutos cada. As imagens dos géis foram capturadas sob iluminação ultravioleta em transiluminador, e as fotos foram submetidas à análise pelo software *BioNumerics* versão 7.6.2 (Applied Maths, Bélgica) (Figuras 2-4).

Figura 2. Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC1 (n=21).

Figura 3. Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC15 (n=20).

Figura 4. Dendrograma 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. Dendrograma gerado a partir da eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii*, com enzima de restrição *Apal*, representativas do CC79 (n=22).

3.5 Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana

3.5.1 Microdiluição em caldo

Para definir as categorias de suscetibilidade, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo de kit comercial (Sensititre, Thermo Scientific). Este kit fornece água estéril para ser realizada a suspensão bacteriana, o meio de cultura Müller-Hinton cátion ajustado e as microplacas contendo os fármacos amicacina, gentamicina, tobramicina, imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloxacina, levofloxacina, piperacilina-tazobactam, ticarciclina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefepime, ceftriaxona, sulfametoxazol-trimetoprim,

ampicilina-sulbactam, colistina, polimixina B, doxicilina, minociclina, aztreonam, tigeciclina, já liofilizados.

Para realização desta técnica foi inicialmente preparado o inóculo a escala 0,5 McFarland de um crescimento bacteriano recente (de até 24 horas) em água estéril fornecida pelo fabricante. Posteriormente, foram adicionados 10 µL desta suspensão bacteriana em um tubo com caldo Müller-Hinton cátion ajustado e distribuído 50 µL na placa com os fármacos liofilizados. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C e após 20-24 horas foi realizada a leitura de acordo com o mapa a seguir (Figura 5).

Thermo
SCIENTIFIC

SENSITITRE™ GRAM NEGATIVE PLATE FORMAT

Plate Code: **GNX3F**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMI 4	GEN 1	TOB 1	CIP 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	CIP 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	CIP 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	CIP 0.5	SXT 4/76	AZT 16	FEP 16	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32
E	DOX 2	MIN 2	TGC 0.25	CIP 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	MIN 4	TGC 0.5	CIP 2	LEVO 2	IMI 2	MERO 2	DOR 0.5	DOR 1	DOR 2	DOR 4	POS
G	DOX 8	MIN 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	MIN 16	TGC 2	TGC 8	LEVO 8	IMI 8	MERO 8	TIM2 16/2	TIM2 32/2	TIM2 64/2	TIM2 128/2	POS

ANTIMICROBICS

AMI	Amikacin
DOX	Doxycycline
GEN	Gentamicin
MIN	Minocycline
TOB	Tobramycin
TGC	Tigecycline
CIP	Ciprofloxacin
SXT	Trimethoprim / sulfamethoxazole
LEVO	Levofloxacin
AZT	Aztreonam
IMI	Imipenem
FEP	Cefepime
MERO	Meropenem
COL	Colistin
POL	Polymixin B
TAZ	Ceftazidime
FOT	Cefotaxime
A/S2	Ampicillin / sulbactam 2:1 ratio
DOR	Doripenem
P/T4	Piperacillin / tazobactam constant 4
TIM2	Ticarcillin / clavulanic acid constant 2
POS	Positive Control

Figura 5. Pannel para leitura de acordo com formato da placa comercial de microdiluição em caldo (Sensititre, Thermo Scientific).

Para a realização do controle negativo foram distribuídos 10 µL do caldo Müller-Hinton não inoculado em placa de TSA ou nutriente para verificação da ausência de contaminação, visto que a placa fornecida pelo

fabricante não há poço disponível para controle negativo. Para leitura e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) destas cepas foram utilizados os pontos de corte definidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2018) e para tigeciclina, para qual não há pontos de corte, foi utilizado o documento do FDA (*Food and Drug Administration*), cujo ponto de corte é suscetível ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, resistente ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$. Para validação do teste foram utilizadas cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. De acordo com o protocolo da Thermo Scientific, usado neste estudo, a capacidade do kit para detectar resistência para *Acinetobacter* spp. para minociclina é desconhecida, pois as cepas resistentes não estavam disponíveis no momento do teste (www.trekds.com/techinfo). Desta forma, os isolados que apresentaram as categorias não suscetíveis foram submetidos à microdiluição em placas preparadas *in house* para este fármaco, bem como para polimixina B, pois de acordo com os documentos EUCAST e CLSI, a microdiluição *in house* é considerado padrão ouro para definição de suscetibilidade das polimixinas (CLSI, 2016; EUCAST, 2016).

Para as placas preparadas *in house*, foi utilizado o caldo Müller-Hinton cátion ajustado, bem como as concentrações dos antimicrobianos (minociclina e polimixina B) a partir de suas respectivas soluções estoque (10 mg/mL). Foi adicionado 1,5 mL da solução em tubo falcon com concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ para minociclina e 64 $\mu\text{g/mL}$ para polimixina B e posteriormente realizadas diluições seriadas 1:2 para outros tubos, nos quais haviam sido adicionados 750 μL a fim de preparar as soluções dos fármacos. Com uma pipeta multicanal foram distribuídos 50 μL do que foi preparado anteriormente em uma microplaca de 96 poços com fundo U, com tampa estéril (Global Trade Technology). As suspensões bacterianas foram ajustadas a escala 0,5 McFarland em solução salina e feita uma diluição 1:150 em caldo Müller-Hinton cátion ajustado para realização do inóculo.

Após esta etapa, 50 μL desta mistura preparada foram distribuídos na microplaca, onde para a placa contendo minociclina corresponde a concentração de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ a 16 $\mu\text{g/mL}$ e para polimixina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$. Foram incubadas em estufa a 37°C e realizada a leitura, após 20-24h de incubação, utilizando os pontos de corte do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2018). Para a validação dos testes foram

utilizadas cepas padrão ATCC de *E. coli* 25922 e ATCC de *P. aeruginosa* 27853 para polimixina B e ATCC de *S. aureus* 29213 e *E. coli* 25922 para minociclina, conforme as recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Cada isolado foi categorizado em: multirresistente (MDR), extensivamente resistente (XDR) e pan-resistente (PDR), de acordo com critérios internacionais propostos por Magiorakos e colaboradores (2012). Como nas placas comerciais utilizadas para realização de microdiluição em caldo não há a presença de tetraciclina, ceftriaxona e netilmicina, estes fármacos foram testados por E-test para confirmação do fenótipo PDR.

A cepa PDR foi cultivada em ágar TSA (Oxoid) e incubada em estufa a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20-24 horas. A partir do crescimento, realizou-se uma suspensão bacteriana em solução fisiológica NaCl 0,85 % na escala 0,5 de McFarland (conc~ $1,5 \times 10^5$ UFC/mL), obtida por meio da leitura do densitômetro (Densicheck Plus – Biomérieux). Em seguida, um swab estéril foi imerso nesta suspensão bacteriana e inoculado de forma homogênea na superfície da placa de ágar Müeller-Hinton e as fitas contendo os antimicrobianos netilmicina, ceftriaxona e tetraciclina (E-test) foram impregnadas manualmente na superfície da placa com posterior incubação $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-20h. A determinação da CIM foi dada no ponto de intersecção entre a zona de inibição do crescimento bacteriano e a fita impregnada com antimicrobiano. Após incubação realizou-se a leitura de inibição do crescimento bacteriano e a interpretação foi feita de acordo com os pontos de corte descritos pelo CLSI (CLSI, 2018). Para validação e controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.6 MALDI-TOF MS

Com a finalidade de padronizar a metodologia e identificar os espectros de cada complexo clonal, foram utilizados os 63 isolados do estudo e 16 isolados pertencentes a outros CC para efeitos comparativos (Barcellos, 2021).

Utilizou-se o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com extratos proteicos obtidos por extração utilizando o protocolo descrito por Hijazin e colaboradores (2012). Em três poços da placa de aço inox com 1 µL de matriz polimérica (10 mg *α*-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid ml⁻¹ em 50% acetonitrila / 2.5% ácido trifluoroacético), foi aliquoteado 1 µL de cada isolado, e realizada leitura de cada placa por três vezes. Foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX e amplitude de 2–20 kDa para captura dos espectros proteicos. A calibração foi realizada através da utilização de proteínas ribossômicas de *E. coli* (BTS - Bruker Daltonik) no espectrofotômetro. As réplicas de espectros proteicos foram utilizadas para produção de espectros de referência/médio ("*main spectrum*" - MSP) no programa BioTyper™ 3.0 (Bruker Daltonik). Os espectros contendo os picos correspondentes à relação massa/carga (*m/z*) e abundância foram exportados para o programa BioNumerics v. 7.6.2 para análise e os dados foram submetidos ao software FlexAnalysis (Bruker Daltonik) para análise de componentes principais (PCA).

A detecção de proteínas ribossomais por espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) foi realizada em parceria com as pesquisadoras Dra. Luisa Moreno e Dra. Andrea Moreno, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

3.7 Sequenciamento de genoma completo

3.7.1 Extração do DNA bacteriano

O material genético das cepas de estudo foi extraído pelo uso de kit comercial (Promega Wizard Genomic DNA Purification kit). Inicialmente a cepa foi semeada em ágar TSA e com uma colônia pura inoculou-se em 1,5 mL de caldo Luria-Bertani para realização da extração. A partir deste crescimento em caldo foi colocado 3 mL em microtubo e centrifugado por 2 minutos a 13000 rpm, para haver a formação do pellet. Foi descartado o

sobrenadante e adicionado 600 µL da solução de lise (disponível pelo kit), misturado gentilmente, incubados a 80°C por 5 minutos e posteriormente deixado à temperatura ambiente. Foi adicionado 3 µL da RNase (disponível pelo kit), homogeneizado, incubado a 37°C por 60 minutos e deixado em temperatura ambiente em torno de 10 minutos. Foi adicionado 200 µL da solução de precipitação de proteína e passados no vortex, incubados em gelo por 5 minutos e centrifugados por 3 minutos a 13000 rpm. Depois desta etapa foi retirado o sobrenadante, transferido para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol, homogeneizados e centrifugados. Adicionou-se etanol 70% a temperatura ambiente e misturados. As amostras foram centrifugadas novamente por 2 minutos a 13000 rpm, retirou-se o etanol e deixadas secando abertas de ponta cabeça dentro da estufa de 30°C por 15 minutos, após secas foram hidratadas com 50 µL de água ultra pura e incubadas a 4°C por 24 horas.

No dia seguinte, foram transferidos para novo microtubo 15 µL do DNA eluído, para quantificação em Nanodrop (Thermo Scientific) e qualificação em gel de agarose a 1%, em eletroforese realizada a 100V, por 60 minutos. Este gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob iluminação ultravioleta. Após realizada a extração do material genético bacteriano utilizando o kit comercial Promega Wizard Genomic DNA Purification, o DNA foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific), apresentando altas concentrações, puras (observadas nas razões A260/A280 e A260/A230, em torno de 2,0 a 2,2).

3.7.2 Preparo da biblioteca e corrida

A biblioteca genômica foi preparada utilizando o Nextera® Sample Preparation e inserção do INDEX com KitNextera®Index. Os produtos da PCR foram purificados usando *beads* magnéticas AMPure XP e a seguir sequenciado na plataforma Illumina HiSeq (Illumina) com cartucho HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2 (Paired end). A presente etapa foi efetivada em parceria com o Dr. Enéas de Carvalho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

3.7.3 Análise do genoma por sequenciamento de genoma completo

Os arquivos fastq gerados foram montados usando o software CLC. Após a realização da montagem dos genomas, os isolados foram submetidos às plataformas online do *Center for Genomic Epidemiology*: MLST (Esquema de Pasteur) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>), a fim de determinar os tipos de sequência (ST) e Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/Resfinder/>), para a identificação dos genes de resistência. Já os sistemas de efluxo foram identificados pelo CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (<https://card.mcmaster.ca/>) e as mutações em *gyrA* e *parC*, bem como as mutações em *pmrAB* e *lpx*, foram detectadas pelo software BioNumerics v.7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) usando como referência *A. baumannii* ATCC 19606 (NCBI Reference Sequence NZ_KL810966.1).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção dos Complexos Clonais por m3LST

Por meio da técnica m3LST, foi possível realizar uma identificação presuntiva dos CC dos isolados de *A. baumannii* estudados, categorizando-os em CC1 (n=21), CC15 (n=20) e CC79 (n=22) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos CC detectados por m3LST em isolados de *A. baumannii* recebidos no IAL, 2016 e 2017 (n=63).

Complexo Clonal	N	%
CC1	21	33,3
CC15	20	31,7
CC79	22	35
Total	63	100

4.2 Detecção das oxacilinases por PCR multiplex

Os isolados foram carreadores de *bla*_{OXA-51-like}, identificando-os como *A. baumannii*. Do total de 63 isolados (CC1=21, CC15=20, CC79=22), 100% dos isolados do CC1, 95,2% do CC15 e 54,4% do CC79 foram carreadores de *bla*_{OXA-23-like} e somente isolados do CC79 (50%) foram carreadores de *bla*_{OXA-24-like} (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de oxacilinases nos isolados de *A. baumannii* pertencentes aos CC1, CC15 e CC79, em isolados recebidos no IAL, no período de 2016 e 2017 (n=63) (n;%).

OXA	CC1	CC15	CC79
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-23-like}	21(100)	19 (95,2)	12 (54,5)
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-24-like}	0 (0)	0 (0)	11 (50)
Total	21 (100)	20 (100)	22 (100)

4.3 Determinação do perfil de suscetibilidade por microdiluição em caldo

Para cada fármaco testado foram definidos os valores de seu percentual de suscetibilidade. Os maiores percentuais de resistência foram observados para as classes dos betalactâmicos e inibidores de betalactamases, atingindo até 100% de resistência. A resistência aos aminoglicosídeos também foi observada, atingindo 76,2% dos isolados do CC1, 95% do CC15 e 81,8% do CC79 para amicacina, 95,2% dos isolados do CC1, 15% do CC15 e 77,3% do CC79 para gentamicina, 100% dos isolados do CC1, 15% do CC15 e 9,1% do CC79 para tobramicina.

Além disso, foram obtidas CIMs elevadas para fluoroquinolonas, como para a ciprofloxacina e levofloxacina, a qual as cepas do CC1 apresentaram 100% e 90,5% resistentes, para o CC15 95% e 75% e para o CC79 apresentaram 100% e 95,5% resistentes, respectivamente (Figura 6, Tabela 3). Enquanto os antimicrobianos que apresentaram atividade *in vitro* foram minociclina (CC1=100%, CC15=95%, CC79=100%), doxiciclina (CC1=95,2%, CC15=85%, CC79=95,5%), colistina (CC1=95,2%, CC15=80%, CC79=91%), polimixina B (CC1= 95,2%, CC15=80%, CC79=91%) e tobramicina (CC15=85%, CC79=86,4%) (Tabela 4).

Figura 6. Distribuição do perfil de suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63).

AK = amicacina, GEN = gentamicina, TOB = tobramicina, DOR = doripenem, IMI= imipenem, MEM = meropenem, CIP = ciprofloxacina, LEV = levofloxacina, TZP = piperacilina-tazobactam, TIM = ticarciclina-ácido clavulânico, CTX = cefotaxima, CAZ = ceftazidima, FEP = cefepime, SXT = sulfametoxazol-trimetoprim, SAM = ampicilina-sulbactam, COL = colistina, POL = polimixina B, DOX = doxiciclina, MIN = minociclina. S= sensível, I= intermediário, R= resistente.

Tabela 4. Determinação do percentual de resistência dos isolados pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 para os fármacos testados em placa comercial GNX3F – Gram Negative AST Plate with Colistin (n=63) [n (%)].

Antimicrobiano	Complexo Clonal					
	CC1		CC15		CC79	
	(n=21)		(n=20)		(n=22)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
AK	16	(76,2)	19	(95)	18	(81,8)
SAM	18	(85,7)	19	(95)	19	(86,4)
FEP	21	(100)	20	(100)	22	(100)
CTX	21	(100)	20	(100)	22	(100)
CAZ	21	(100)	20	(100)	22	(100)
CIP	21	(100)	19	(95)	22	(100)
COL	1	(4,8)	4	(20)	2	(9)
DOR	21	(100)	20	(100)	22	(100)
DOX	1	(4,8)	2	(10)	1	(4,5)
GEN	20	(95,2)	3	(15)	17	(77,3)
IMI	21	(100)	20	(100)	22	(100)
LEV	19	(90,5)	15	(75)	21	(95,5)
MEM	21	(100)	20	(100)	22	(100)
MIN	0	(0)	1	(5)	0	(0)
TZP	21	(100)	20	(100)	22	(100)
POL	1	(4,8)	4	(20)	2	(9)
SXT	19	(90,5)	13	(65)	22	(100)
TIM	21	(100)	20	(100)	22	(100)
TOB	21	(100)	3	(15)	2	(9,1)

O perfil de suscetibilidade mostrou que a maior parte dos isolados dos clones de alto risco são XDR (84,1%) e um isolado foi categorizado como PDR (1,6%), do ST15 (CC15), de acordo com os critérios internacionais por Magiorakos e colaboradores (2012) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos fenótipos de resistência de isolados clínicos de *A. baumannii* pertencentes aos complexos clonais 1, 15 e 79 [n (%)] (Magiorakos et al., 2012).

Complexo Clonal	MDR	XDR	PDR
CC1	2 (9,5)	19 (90,5)	0 (0)
CC15	6 (30)	13 (65)	1 (5)
CC79	1 (4,5)	21 (95,5)	0 (0)
Total	9 (14,3)	53 (84,1)	1 (1,6)

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

Para confirmar o fenótipo PDR, foi realizado o E-test para os fármacos netilmicina, ceftriaxona e tetraciclina, não contidos na placa de microdiluição comercial GNX3F e que são necessários para a classificação de Magiorakos et al., 2012. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Perfil de suscetibilidade da cepa *A. baumannii* PDR, pertencente ao ST15 (CC15) (n=1).

ANTIMICROBIANO	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Amicacina	>32
Ampicilina-sulbactam	>64/32
Cefepime	>16
Cefotaxima	>32
Ceftazidima	>16
Ceftriaxona	>32
Ciprofloxacina	>2
Colistina	>4
Doripenem	>4
Doxaciclina	16
Gentamicina	>8
Imipenem	>8
Levofloxacina	8
Meropenem	>8
Minociclina	32
Netilmicina	>256
Piperacilina-tazobactam	>64/4
Polimixina B	16
Sulfametoxazol-trimetoprim	>4/76
Tetraciclina	16
Ticarclina- ácido clavulânico	>128/2
Tobramicina	>8

4.4 MALDI-TOF

Com os picos gerados pelo MALDI-TOF, os dados foram analisados por PCA (*Principal Components Analysis*), o qual não agrupou as cepas com CC (Barcellos, 2021; Barcellos et al., 2020).

4.5 Sequenciamento de genoma completo

Através da análise do sequenciamento de genoma completo foi possível realizar o MLST (Esquema do Instituto Pasteur), que possibilitou classificar os isolados do estudo em ST1, ST15, ST79, ST20, ST730 e ST1447 (novo ST), como podemos observar na Tabela 7.

Tabela 7. Relação dos ST identificados por MLST (Esquema de Pasteur) e a distribuição da frequência dos isolados entre os ST encontrados entre os isolados de *A. baumannii* (n=63).

ST	Alelos							CC	Frequência	
	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>		N	%
1	1	1	1	1	5	1	1	1	20	95
15	6	6	8	2	3	5	4	15	19	95
79	26	2	2	2	29	4	5	79	20	91
730	26	6	2	2	29	4	5	79	2	9
20	3	1	1	1	5	1	1	1	1	5
1447*	6	6	8	103**	3	5	4	15	1	5

Legenda: ST- Sequence type; CC- Complexo Clonal; * ST novo; ** alelo novo.

Além disso, essa metodologia permitiu identificar o alelo de cada um dos genes *bla*_{OXA-51-like}. Todos os isolados foram confirmados como *A. baumannii*, os quais 100% do CC1 apresentaram *bla*_{OXA-69}, 100% do CC15 o alelo *bla*_{OXA-51} e 100% dos isolados do CC79 o *bla*_{OXA-65} (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição dos alelos do gene *bla*_{OXA-51-like} em relação ao CC/ST de isolados de *A. baumannii* (n=63).

Alelo	Complexo Clonal (CC) / Sequência Tipo (ST)					
	CC1		CC15		CC79	
	ST1	ST20	ST15	ST1447	ST79	ST730
<i>bla</i> _{OXA-69}	20	1				
<i>bla</i> _{OXA-51}			19	1		
<i>bla</i> _{OXA-65}					19	3
Total	21		20		22	

Uma variedade de genes de resistência foi detectada nos genomas dos isolados dos CC para os fármacos das classes dos betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, cloranfenicol e antagonista da via do folato (sulfametoxazol-trimetoprim) (Tabela 9), mutações em fluoroquinolonas (Tabela 10) e polimixinas (Tabela 11), além dos sistemas de efluxo envolvidos (Tabela 12).

Observou-se a presença de genes em comum aos isolados do CC1, CC15 e CC79, tais como *bla*_{OXA-23} e *aph(3')-Vla*. Entretanto, a comparação entre o perfil de suscetibilidade, a presença de genes de resistência e os sistemas de efluxo demonstraram dados relacionados aos diferentes Complexos Clonais, como *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6)-Ib-cr*, *sul1* para CC1 e *bla*_{OXA-72}, *bla*_{TEM-1A}, *aadA1*, *strA*, *strB*, *msrE*, *mphE*, *sul2*, *floR*, *dfrA1*, *sat-2* para CC79, como podemos observar na tabela a seguir, aos quais tais genes de resistência possuem altos percentuais nos CC1 e CC79 ($p<0,05$).

Tabela 9. Distribuição do percentual dos genes de resistência presentes nos isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63).

Gene de resistência antimicrobiana	Complexo Clonal					
	CC1		CC15		CC79	
	(n=21)		(n=20)		(n=22)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>aac(3)-Ia</i>	12	(57,1)	0	(0)	4	(18,2)
<i>aadA1</i>	11	(52,4)	0	(0)	22	(100)
<i>aph(3')-VIa</i>	4	(19)	16	(80)	19	(86,4)
<i>aac(3)-IIa</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>aac(6')-Ia</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>aac(6')-Ib3</i>	19	(90,5)	1	(5)	1	(4,5)
<i>aph(3'')-Ib/strA</i>	5	(23,8)	3	(15)	18	(81,8)
<i>aph(6)-Id/strB</i>	4	(19)	3	(15)	18	(81,8)
<i>bla_{OXA-23}</i>	21	(100)	19	(95,2)	12	(54,5)
<i>bla_{OXA-72}</i>	0	(0)	0	(0)	11	(50)
<i>bla_{OXA-253}</i>	0	(0)	1	(5)	1	(4,5)
<i>bla_{TEM-1A}</i>	0	(0)	0	(0)	22	(100)
<i>bla_{TEM-1B}</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	21	(100)	1	(5)	2	(9)
<i>msrE</i>	3	(14,3)	12	(60)	18	(81,8)
<i>mphE</i>	3	(14,3)	12	(60)	17	(77,3)
<i>floR</i>	4	(19)	1	(5)	16	(72,7)
<i>sul1</i>	14	(66,7)	0	(0)	3	(13,6)
<i>sul2</i>	5	(23,8)	10	(47,6)	22	(100)
<i>tetA</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>tetB</i>	0	(0)	1	(5)	1	(4,5)

<i>tet39</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>tetR</i>	0	(0)	1	(5)	0	(0)
<i>dfrA1</i>	0	(0)	0	(0)	22	(100)
<i>sat2</i>	0	(0)	0	(0)	19	(86,4)

Além de genes de resistência adquiridos, foram encontradas mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR) em *gyrA* (S81L) em todos os isolados do CC1, CC15 (100%) e 95,5% do CC79 (n=21) e 4,5% (n=1) do CC79 apresentou a mutação S14L. Em relação ao *parC*, todas as cepas do CC1 (100%; n=21) e do CC15 (100%; n=20) tiveram a mutação S84L, enquanto que as do CC79 houveram as mutações S84Y (63,7%; n=14), E88K (18,2%; n=4), S84F (13,6%; n= 3) e S32Y (4,5%; n=1). Já mutações simultâneas foram detectadas em 4 cepas (19%) em *gyrA* pertencentes ao CC1 e 1 (4,5%) do CC79 (S81L e E85G). O espectro de mutações e as frequências do perfil de resistência correspondentes são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade em relação às mutações encontradas em fluoroquinolonas nos clones de alto risco de *A. baumannii*.

Gene	Mutação	CC	Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade (%; n)						Frequência de mutações (%; n)	
			CIPROFLOXACINA			LEVOFLOXACINA				
			S	I	R	S	I	R		
gyrA	E85G*	1	-	-	100 (4)	-	-	100 (4)	19 (4)	
		79	-	-	100(1)	-	-	100 (1)	4,5 (1)	
	S81L	1	-	-	100 (21)	-	9,5 (2)	90,5 (19)	100 (21)	
		15	-	5 (1)	95 (19)	-	30 (6)	70 (14)	100 (20)	
		79	-	-	100 (22)	-	-	100 (22)	95,5 (21)	
	S14L	79	-	100 (1)	-	-	100 (1)	4,5 (1)		
parC	S84L	1	-	-	100 (21)	-	9,5 (2)	90,5 (19)	100 (21)	
		15	-	5 (1)	95 (19)	-	30 (6)	70 (14)	100 (20)	
		S84Y	79	-	-	100 (22)	-	-	100 (22)	63,7 (14)
		E88K		-	-	100 (4)	-	-	100 (4)	18,2 (4)
		S84F		-	-	100 (3)	-	-	100 (3)	13,6 (3)
		S32Y		-	100 (1)	-	-	100 (1)	4,5 (1)	

Legenda: CC= Complexo Clonal, *Mutações simultâneas com S81L, S=sensível, R=Resistente, I=Intermediário.

Para as cepas resistentes às polimixinas, foram identificadas mutações não silenciosas no gene *pmrA* (M12I, F105L) em 2 cepas do CC15, em *pmrB* (S14L) em apenas uma cepa do CC1, enquanto que o CC15 apresentou mutação em três isolados em E185K, V351G, D77E e para o CC79 duas cepas em L274W e P170T. Já para o gene *lpxD*, as mutações ocorreram em duas cepas do CC15 em A273G. Para *lpxB* nenhuma mutação foi encontrada. O espectro de mutações e os valores de CIM correspondentes são ilustrados na Tabela 11.

Tabela 11. Mutações encontradas nos genes *pmrA*, *pmrB* e *lpxD* e valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de polimixina B e colistina de isolados de *A. baumannii* pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 resistentes às polimixinas (n=7).

Cepas	CC	Mutações				CIM (µg/mL)	
		<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>lpxB</i>	<i>lpxD</i>	POL	COL
181/17	1	-	S14L	-	-	8R	>4R
60	15	M12I	-	-	-	>16R	>4R
359/16		-	E185K	-	A273G	8R	>4R
697/16		F105L	V351G	-	-	16R	>4R
414/17		-	D77E	-	A273G	16R	>4R
917/16	79	-	L274W	-	-	>16R	4R
541/17		-	P170T	-	-	16R	>4R

Legenda: CC= Complexo Clonal, CIM= Concentração Inibitória Mínima, POL= Polimixina B, COL= Colistina, S= Sensível, R= Resistente.

Quanto aos sistemas de efluxo, Adel, AbeS, AdeK, AdeF e AmvA foram observados em todos os isolados do CC1, CC15 e CC79. Já AdeC, AdeH, AdeG, AdeL e AbeM foram presentes em CC específicos, como AdeC, AdeH e AdeG no CC1, AdeL no CC1 e CC15 e AbeM no CC79, como observamos na Tabela 12.

Tabela 12. Distribuição dos sistemas de efluxo presentes nos isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC1, CC15 e CC79 (n=63).

Sistemas de Efluxo	CC1 n=21	CC15 n=20	CC79 n=22
AdeC	20 (95,2)	-	-
AdeG	20 (95,2)	-	-
AdeH	21 (100)	-	-
AbeM	-	-	21 (95,5)

Ao comparar os resultados das cepas sensíveis com as resistentes, podemos observar aspectos diferenciados em seus genomas. Como por exemplo, as que foram sensíveis a amicacina, gentamicina e tobramicina não carregavam nenhum gene que confere resistência aos aminoglicosídeos ou portavam apenas um gene, como *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id/strB*, *aadA1* e *aph(3)'Via*. Quanto as que apresentaram a categoria de intermediária a fluoroquinolonas, por sua vez, não possuíam o gene *aac(6')-Ib-cr*. Já as cepas que apresentaram sensibilidade às tetraciclinas, não portavam os sistemas de efluxo Tet (TetA, TetB, TetR), AdeIJK, AdeF, AdeL. E as que possuíam sensibilidade para sulfametoxazol-trimetoprim, também não eram carreadoras de gene específicos que conferem resistência, como *sul1*, *sul2* e *dfrA1* (Figura 7, Tabela 13-16).

Tabela 13. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade, genoma de cepas intermediárias e resistentes às fluoroquinolonas.

CC	Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade (% (n))						Genoma de cepas intermediárias	Genoma de cepas resistentes
	Ciprofloxacina			Levofloxacina				
	S	I	R	S	I	R		
1	-	-	100(21)	-	9,5(2)	90,5(19)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , AdelJK, AdeH, AdeG, AdeR, AdeL	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , AdelJK, AdeH, AdeG, AdeR, AdeL
15	-	5(1)	95(19)	-	25(5)	75(15)	AdelJK	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , AdeL, AdelJK, AdeR
79	-	4,5(1)	100 (22)	-	-	95,5 (21)	AdelJK	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , AbeM, AdelJK, AdeL

Legenda: CC: Complexo clonal, S: sensível, I: intermediário, R: resistente, -* : ausência de gene de resistência e sistema de efluxo que conferem resistência à fluoroquinolonas.

Tabela 14. Frequência de resistências inferidas no genoma de cepas dos clones de alto risco de *A. baumannii* não suscetíveis a pelo menos um aminoglicosídeo, bem como categorias do perfil de suscetibilidade.

Genes de resistência	CC	Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade (%; n)									Frequência de genes
		AK			GEN			TOB			de resistência (%; n)
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	
aac(3)Ia	1	-	19(4)	36,4(8)	-	4,7(1)	52,3(11)	-	4,7(1)	52,3(11)	57,2(12)
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	79	-	-	18,2(4)	-	-	18,2(4)	-	(1)	18,2(4)	18,2(4)
aac(6')Ib3	1	-	9,5(2)	85,7(18)	-	4,7(1)	90,5(19)	-	4,7(1)	90,5(19)	95,2(20)
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	79	-	4,5(1)	-	-	-	4,5(1)	-	-	4,5(1)	4,5(1)
aph(3'')Ib	1	-	-	23,8(5)	-	-	23,8(5)	-	-	23,8(5)	23,8(5)
	15	-	-	15(3)	-	-	15(3)	5(1)	-	10(2)	15(3)
	79	9(2)	4,5(1)	68,2(15)	4,5(1)	9(2)	68,2(15)	72,7(16)	4,5(1)	4,5(1)	81,9(18)
aph(6)Id	1	-	-	19(4)	-	-	19(4)	-	-	-	19(4)
	15	-	-	15(3)	5(1)	-	10(2)	5(1)	-	10(2)	15(3)

	79	4,5(1)	4,5(1)	68,2(15)	4,5(1)	13,6(3)	59(13)	4,5(1)	4,5(1)	68,2(15)	77,3(17)
<i>aadA1</i>	1	-	19(4)	33,3(7)	-	4,7(1)	47,6(10)	-	4,7(1)	47,6(10)	52,4(11)
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	79	13,6(3)	4,5(1)	81,8(18)	9(2)	13,6(3)	77,3 (17)	86,4(19)	4,5(1)	9(2)	100(22)
<i>aph(3')-Ia</i>	1	-	19(4)	38(8)	-	4,7(1)	52,4(11)	-	4,7(1)	52,4(11)	57,2(12)
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	79	-	-	13,6(3)	-	-	13,6(3)	9(2)	4,5(1)	-	13,6(3)
<i>aph(3')VIa</i>	1	-	4,7(1)	14,3(3)	-	-	19(4)	-	-	19(4)	19(4)
	15	-	-	80(16)	60(12)	10(2)	10(2)	70(14)	-	10(2)	80(16)
	79	4,5(1)	4,5(1)	68,2(15)	9(2)	4,5(1)	63,6(14)	68,2(15)	4,5(1)	4,5(1)	77,3(17)

Legenda: CC: Complexo clonal, S: Sensível, I: Intermediário, R: Resistente, AK: Amicacina, GEN: Gentamicina, TOB:Tobramicina.

Tabela 15. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade, genoma de cepas sensíveis e resistentes às tetraciclinas.

CC	Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade (%; n)						Genoma de cepas sensíveis	Genoma de cepas resistentes
	Minociclina			Doxiciclina				
	S	I	R	S	I	R		
1	21(100)	-	-	95,3(20)	-	4,7(1)	-*	AdelJK, AdeN, AdeF
15	95(19)	-	5(1)	85(17)	5(1)	10(2)	-*	TetA, TetB, TetR
79	22(100)	-	-	95,5(21)	-	4,5(1)	-*	AdelJK, AdeN, AdeF

Legenda: CC: Complexo clonal, S: sensível, I: intermediário, R: resistente, -*: ausência de sistemas de efluxo para tetraciclinas.

Tabela 16. Comparação da frequência das categorias do perfil de suscetibilidade de sulfametoxazol-trimetoprim, genes de resistência e genoma de cepas sensíveis e resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim.

CC	Frequência das categorias do perfil de suscetibilidade (%; n)			Frequência de genes de resistência (%; n)			Genoma de cepas sensíveis	Genoma de cepas resistentes
	Sulfametoxazol-trimetoprim			sul1	sul2	dfrA1		
	S	I	R					
1	9,5(2)	-	90,5(19)	66,7(14)	23,8(5)	-	-*	sul1, sul2
15	35(7)	-	65(13)	10(2)	40(8)	-	-*	sul1, sul2
79	-	-	100(22)	18,2(4)	100(22)	100(22)	-*	sul1, sul2, dfrA1

Legenda: CC: Complexo clonal, S: sensível, I: intermediário, R: resistente, -*: ausência de genes de resistência para sulfametoxazol-trimetoprim.

Figura 7. Ilustração do perfil de suscetibilidade compilado aos dados genômicos encontrados nos clones de alto risco de *A. baumannii*.

Legenda: AK= amicacina, GEN= gentamicina, TOB= tobramicina, CIP= ciprofloxacina, LEV= levofloxacina, CTX= cefotaxima, CAZ= ceftazidima, FEP= cefepime, IMI= imipenem, MERO= meropenem, DOR= doripenem, SAM= ampicilina-subactam, TZP= piperaciclina-tazobactam, TIM= ticarciclina-clavunalato, SXT= sulfametoxazol-trimetoprim, MINO= minociclina, DOX= doxiciclina, POL= polimixina B, COL= colistina. O que está em vermelho indica resistência aos antimicrobianos, amarelo: perfil intermediário, verde: sensibilidade, preto: presença dos genes de resistência ou sistema de efluxo, branca: ausência de genes de resistência ou sistemas de efluxo. Na coluna inicial as cepas pertencentes aos CC estão separadas por cores: roxa: CC1, azul: CC15 e rosa: CC79.

5 DISCUSSÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) continuam a crescer a um ritmo alarmante e no Brasil nos últimos anos a disseminação de isolados de *A. baumannii* é identificada com frequência, havendo a persistência dos CC1, CC15 e CC79. Sabe-se que o tratamento adequado tem impacto direto nas infecções causadas por esse patógeno (Lemos et al., 2014; Leão et al., 2016), porém, pronunciados níveis de resistência, como a extensiva resistência (XDR) está relacionada aos clones de alto risco (Diancourt et al., 2010; Vasconcellos et al., 2017b). Em nosso estudo, observamos altas taxas de isolados XDR pertencentes aos CC1, CC15 e CC79, reforçando essa ideia, além de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos testados (PDR) pertencente ao ST15. Quanto ao fenótipo PDR, Karakostas e colaboradores (2019) apontam a difusão desse microrganismo entre as instituições e que cepas de *A. baumannii* encontram-se entre os gram-negativos PDR mais relatados no mundo, como em países do continente europeu e asiático. Dessa forma, isso nos mostra a necessidade da implantação de medidas de contenção para evitar a disseminação desses patógenos associados a altos índices de morbidade, mortalidade e custos gerados aos sistemas de saúde.

Os antimicrobianos que apresentaram maiores taxas de atividade *in vitro* foram minociclina, doxiciclina, colistina e polimixina B para os CC1, CC15 e CC79, além de tobramicina para isolados do CC15 e CC79. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos foi classificado no grupo de microrganismos com importância crítica para a obtenção de novos fármacos (Shlaes e Bradford, 2018). Morris e colaboradores (2019) afirmam que sem medidas efetivas para contenção deste patógeno, as infecções se tornarão intratáveis. De fato, o tratamento de infecções por esse patógeno é desafiador, com o surgimento da resistência no cenário mundial, se torna um fator prejudicial à terapia antimicrobiana, porém fármacos das classes das polimixinas e tetraciclina são considerados opções terapêuticas de escolha nos últimos anos (Ezadi et al., 2019; Isler et al., 2019).

Por outro lado, em nossa amostragem há o surgimento de cepas resistentes à classe das polimixinas, e essa resistência pode ser atribuída por mutações não silenciosas em *pmrA*, *pmrB* e *lpxD*. Estudos apontam que mutações em *pmrA*, *pmrB* e *lpx* parecem ser razões pelas quais ocorrem o fenótipo de resistência (Poirel et al., 2017; Ezadi et al., 2019; Moffatt et al., 2019). Além destes mecanismos, é documentado que o gene *mcr* também confere resistência às polimixinas em *A. baumannii* (Ma et al., 2019; Martins-Sorenson et al., 2020), todavia não encontramos em nosso estudo.

Conforme esperado, verificamos que os isolados estudados, independente do CC, apresentaram co-resistências aos antimicrobianos. Quanto à resistência aos betalactâmicos, as betalactamases desempenham um papel crucial, especialmente as oxacilinases em *A. baumannii*. Podemos observar esse fator o qual 100% dos isolados do CC1, 95,2% do CC15 e 54,5% do CC79 são carreadores de *bla*_{OXA-23}. Esses dados reforçam o conceito que a OXA-23 é considerada amplamente difundida ao redor do mundo em diferentes clones (Medeiros e Lincopan, 2013; Rocha et al., 2017; Rodríguez et al., 2018), incluindo o Brasil, onde sua predominância supera os valores de 90% em estudos nacionais (Chagas et al., 2014; Tavares et al., 2018; Pagano et al., 2019).

Em relação à OXA-51, observamos que seus alelos (*bla*_{OXA-69}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-65}) estão associados com os CC1, CC15 e CC79, respectivamente, o que possui boa correspondência a estudos anteriores, conforme previamente reportados para as linhagens epidêmicas, como OXA-69 ao CC1, OXA-66 ao CC2, OXA-71 ao CC3, OXA-51 ao CC15, OXA-65 ao CC79 (Evans et al., 2008; Pournaras et al., 2014; Boettger et al., 2020). Apesar deste não ser um achado novo, confirma estudos anteriores e abre a possibilidade de utilizar um único gene para caracterização dos CC circulantes no Brasil.

Além dessas oxacilinases documentadas, a variante OXA-72 encontra-se expandida entre diferentes instituições na América Latina (Vasconcelos et al., 2015; Nuñez Quezada et al., 2016; Levy-Blitchtein et al., 2018), encontrada até em aves aquáticas, o que demonstra uma

disseminação fora do ambiente hospitalar (Narciso et al., 2020). Nossos resultados condizem com a literatura, uma vez que essa oxacilinase vem sendo reportada nos últimos anos juntamente ao CC79 (de Sá Cavalcanti et al., 2013; Vasconcellos et al., 2015; Camargo et al., 2016; Pagano et al., 2017; Leal et al., 2020), como observamos em 50% dos isolados do CC79. Todavia, essa oxacilinase já foi descrita em cepas do CC15, ST25 e do ST78 (Nunez Quezade et al., 2016; Pagano et al., 2017; Fonseca et al., 2020).

Outra oxacilinase encontrada em nossa amostragem foi a OXA-253 em um isolado do ST15 e outro do ST79. O seu primeiro relato, no Brasil, foi em uma cepa pertencente ao ST113, em Belo Horizonte (Girlich et al., 2014), porém trabalhos mostram que nos últimos anos o *bla*_{OXA-253} emergiu nos ST1, ST15, ST25 e ST79, sugerindo uma propagação desse gene de resistência pelo nosso país (de Sá Cavalcanti et al., 2017; Leal et al., 2020).

No que se diz respeito à resistência aos aminoglicosídeos, o mecanismo mais comum é a produção de AMEs (Polotto et al., 2019). Em nosso trabalho encontramos 9 genes codificadores de AMEs, *aac(3) – Ia*, *aadA1*, *aph(3') – VIa*, *aac(3) – IIa*, *aac(6')-Ia*, *aac(6')-Ib3*, *aph(3'')-Ib/strA*, *aph(6)-Id/strb* e *aac(6)-Ib-cr*, que contribuíram para o fenótipo de resistência apresentado. Nossos dados são condizentes com o estudo de Leal e colaboradores (2020), uma vez que ao ser analisado os resultados do perfil de suscetibilidade e a expressão dos genes de resistência, podemos perceber que alguns genes de AMEs sugerem uma associação aos CC. Como a resistência à tobramicina, que foram maiores em isolados do CC1, com a presença de *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib3* e *aac(6)-Ib-cr*. E da mesma forma, *aadA1*, *aph(3'')-Ib/strA*, *aph(6)-Id/strB* para o CC79. Por outro lado, Nemec e colaboradores (2004), relatam que 95% dos isolados pertencentes aos CC1 e CC2, resistentes aos aminoglicosídeos, carregam pelo menos um gene de AMEs. Assim como no trabalho de Boettger e colaboradores (2020), que estudaram seis isolados de *A. baumannii* de um hospital terciário de São Paulo, o qual 100% das cepas, que pertenciam aos ST1, ST25, ST79 e ST162, carregavam *aph3-VIa*, *aadA1*, *aac(3)-IIa*, *aph6-Id*, *strA* e *strB*. Outros estudos anteriores também mostram que isolados do CC2, assim como ST25, ST79 e ST162, também podem carrear os genes *aac(3)-Ia*, *strA* e *strB* (Tan et al., 2013; Potron et al., 2019).

Além de conferir resistência aos aminoglicosídeos, o gene *aac (6)-Ib-cr*, codificado por plasmídeo, também tem influência na suscetibilidade reduzida em fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e norfloxacina (Dalhoff, 2012; Redgrave et al., 2014). Entretanto, o mecanismo de resistência mais descrito é mediado por mutações na DNA girase e topoisomerase IV, nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, especialmente *gyrA* e *parC* em bactérias gram-negativas (Park et al., 2011; Chopra e Galande, 2011). Podemos notar esses fatores em nossos resultados, os quais o perfil de suscetibilidade de levofloxacina e ciprofloxacina foram categorizados em não-suscetíveis (resistentes ou intermediários) e a análise dos dados do genoma mostra mutações em *gyrA* e *parC*, como em S81L, E85G em *gyrA* e S84L, S84Y, S32Y, E88K e S84F em *parC*, o que podem ser associadas com as altas taxas de resistência às fluoroquinolonas. Entretanto, o que é normalmente encontrado em *A. baumannii*, independente de CC, são mutações em S83L e S80L em *gyrA* e *parC*, respectivamente (Wisplinghoff et al., 2003; Hamouda e Amyes, 2004; Liu et al., 2012; Zaki et al., 2018).

Além disso, um mecanismo secundário na indução de resistência em *A. baumannii* para ciprofloxacina tal qual para outros antimicrobianos é o sistema de efluxo (Park et al., 2011; Singh et al., 2020). Como bem documentado na literatura, os sistemas de efluxo em *A. baumannii* pertencem à família da divisão de nodulação por resistência (RND), família de extrusão de compostos tóxicos e multifármacos (MATE), superfamília de facilitadores principais (MFS) ou pequenas drogas múltiplas família de resistência (SMR) (Coyne et al., 2011; Abdi et al., 2020).

Em nossa amostragem foi observada os sistemas de efluxo RND (AdeC, AdeIJK, AdeL, AdeN, AdeFGH, AdeR), seguido de MFS (AbaQ, AbaF, AmvA), MATE (AbeM), e SMR (AbeS), o que corrobora com estudos anteriores quando se referem que as famílias de efluxo estão relacionadas à resistência nesse patógeno são pertencentes as classes RND e MFS com maior frequência (Wieczorek et al., 2008; Blair et al., 2015; Abdi et al., 2020). Todas as cepas do CC1 (100%; n=21) e do CC15 (100%; n=20) e 91% (n=20) do CC79 apresentaram AbaQ, enquanto que apenas cepas do CC79 portaram AbeM.

Os sistemas citados são responsáveis pelo efluxo das fluoroquinolonas, mas existem outros como AdeIJK, AdeF, AdeH, que exportam essa e mais de uma classe de antimicrobiano (Coyne et al., 2011;

Abbas et al., 2020), como também foi observado em nossos resultados. O AbaQ por exemplo, encontra-se amplamente difundido em *A. baumannii* e o primeiro da família de MFS, que desempenha um papel importante no efluxo de fluoroquinolonas (Pérez-Varela et al., 2018). Já AbeM não é tão difuso quanto AbaQ e aumenta quatro vezes as CIMs de norfloxacin, ciprofloxacina e gentamicina, enquanto que para cloranfenicol e trimetoprim aumenta duas vezes (Vila et al., 2007).

Os isolados desse trabalho apresentam AdeFGH e AdeIJK, além de ambos expulsarem fluoroquilonas e tetraciclinas, o AdeIJK também é responsável pelo efluxo de cloranfenicol e betalactâmicos. Ao passo que são superexpressos podem elevar a CIM dos antimicrobianos e quando associados a outros mecanismos adicionais levam a multirresistência (Coyne et al., 2010; Coyne et al., 2011). Em relação ao AdeC (do sistema AdeABC), que confere resistência a tetraciclina e tigeciclina, de acordo com Xu e colaboradores (2019), com a presença desse sistema, as cepas tem uma tendência em apresentar taxas de resistência maiores. Em nosso estudo nota-se a relação de sistemas de efluxo com CC, como AbeM com o CC79 e o AdeL, AdeC, AdeG e AdeH com o CC1, porém até o momento não há dados que corroborem com esses resultados. Já em relação ao CC15, não foi observado um sistema de efluxo específico ligado somente a esse CC em nosso trabalho.

Embora os sistemas de efluxo AdeFGH, AdeIJK, AdeR sejam capazes de expulsar as tetraciclinas, as bombas Tet são os mecanismos de resistência mais relatados a essa classe terapêutica, especialmente TetA e TetB (Martí et al., 2006; Vila et al., 2007; Wang et al., 2017). A análise dos dados do genoma mostrou apenas uma cepa do CC15 (cepa PDR) apresentou TetA, TetB, TetR e Tet39 e uma cepa do CC79 TetB. Segundo Wang e colaboradores (2017), a expressão de TetB pode implicar na resistência a minociclina e doxiciclina, porém os autores afirmam que podem ser necessários outros mecanismos de efluxo para aumentar as CIMs desses antimicrobianos, como observamos na cepa PDR, por exemplo, a qual teve para minociclina e doxiciclina CIM de 32 e 16 mg/L, respectivamente.

Outros sistemas de efluxo encontrados nas cepas do CC1, CC15 e CC79 foram AbaF, AmvA e AbeS. O sistema AbaF é responsável pelo efluxo de fosfomicina, embora *A. baumannii* apresente resistência a esse antimicrobiano, há dados que demonstraram resultados promissores quando associado com colistina, polimixina B e minociclina (Zhang et al., 2013; Sirijatuphat et al., 2014; Sertcelik et al., 2020). Quanto ao AmvA, o fenótipo de resistência a eritromicina, bem como a desinfetantes e detergentes pode ser atribuído a esse sistema de efluxo (Rajamohan et al., 2010; Lin et al., 2017). E em relação ao AbeS, trabalhos apontam que esse sistema confere suscetibilidade reduzida a eritromicina, cloranfenicol, fluoroquinolonas e resistência a detergentes e desinfetantes (Srinivasan et al., 2009; Coyne et al., 2011).

Segundo Sharma e colaboradores (2017) a importância desses mecanismos de resistência é destacada por haver um predomínio, se não em todas as cepas clínicas desse micro-organismo, o que mostra consistência com nossos resultados, os quais AmvA e AbeS foram presentes em 100% das cepas dos CC1, CC15 e CC79, e AbaF em 95,2% das cepas do CC1, 100% do CC15 e 95,5% do CC79. Isso gera uma preocupação em ambiente hospitalar, uma vez que sistemas de efluxo são capazes de expulsar soluções desinfetantes e fármacos que poderiam ser uma forma alternativa quando associados a outras classes terapêuticas para o desfecho clínico em infecções causadas por patógenos MDR e XDR (Kempf et al., 2012; Zhang et al., 2013; Liu et al., 2020).

A comparação dos resultados do perfil de suscetibilidade e do genoma também pode explicar a CIM elevada de sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), pela expressão dos genes *sul1*, *sul2* e *dfrA1*. Assim como no trabalho de Girija e colaboradores (2019), que evidenciam a relação desses genes, acrescentando *dfrA5*, como os principais determinantes de resistência a SXT. Além disso, mostramos genes que foram mais frequentes em isolados específicos de um CC, como *sul2*, *dfrA1*, *sat2*, *floR*, *mphE* e *msrE* para o CC79, o que tem boa correspondência com o estudo de Leal e colaboradores (2020). Quanto ao *floR*, trata-se de um gene observado de fato nos últimos anos no ST79 (Cerezales et al., 2019; Boettger et al., 2020; Cerezales et al., 2020), porém também encontrado no ST15 na Bolívia mais recentemente

(Cerezales et al., 2019). Da mesma forma, já foi relatado em trabalhos anteriores a presença de *dfrA1* e *sat-2* em outros CC de *A. baumannii*, como na Argentina e no Uruguai nos CC1, CC3 e CC15 (Ramírez et al., 2010; Ramírez et al., 2012) e *mphE* e *msrE* em isolados do CC1 no Brasil (Boettger et al., 2020).

O motivo pelo qual os clones de alto risco são prevalentes no Brasil ainda precisa ser descoberto. Entretanto, nosso estudo revelou a prevelência do fenótipo XDR na maioria dos isolados do CC1, CC15 e CC79 e o surgimento de uma cepa PDR, pertencente ao CC15, além de ser descrito o ST1447, novo ST do CC15. Nossos resultados confirmam análises anteriores, destacando a diversidade de determinantes de resistência simultâneos no genoma de *A. baumannii*, o que foi atribuído ao perfil fenotípico apresentado e ainda sugerem-se associações de resistência específicas aos complexos clonais. Aqui também mostramos o surgimento da resistência à classe das polimixinas e tetraciclina, fármacos de escolha no tratamento de infecções por *A. baumannii* XDR. Neste contexto, o sequenciamento de genoma completo demonstrou ser uma boa ferramenta para caracterização da resistência.

Já em relação ao MALDI-TOF não foi possível a identificação dos clones de alto risco como propusemos, devido à faixa de tamanhos de proteínas analisadas com o Bruker Biotyper, limitada pelo tempo de voo decorrente do comprimento de seu tubo de vácuo, apenas proteínas que variam de m/z 2.000 a 20.000 são analisadas no equipamento da Bruker BioTyper, o que limita analisar as proteínas que podem ser associadas à clonalidade. Como o alvo do equipamento são as proteínas ribossomais, que mostraram ser altamente conservadas entre os diferentes CC decorrentes da ocorrência de mutações silenciosas nos genes codificadores destas proteínas, não houve discriminação observável nesta abordagem.

Nossa análise revela informações cruciais para a compreensão do perfil de suscetibilidade dos CC1, CC15 e CC79 de *A. baumannii*, bem como os mecanismos de resistência envolvidos. Destacamos a predominância do fenótipo XDR, aparecimento de PDR e determinantes de resistência associados a CC. O motivo pelo qual os clones de alto risco são prevalentes no Brasil ainda precisa ser descoberto. É importante ressaltar que esse patógeno vem sendo um dos gram-negativos de sucesso, devido à sua grande capacidade de resistência antimicrobiana. Métodos de identificação, caracterização e de controle de infecção contribuem para conter sua propagação.

6 CONCLUSÕES

- Pode-se observar a predominância do fenótipo XDR e o primeiro relato de PDR entre isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC15 no Brasil.
- Foi observada a ocorrência de não-suscetibilidade *in vitro* a polimixina B, colistina, doxiciclina e minociclina, antimicrobianos utilizados como opções terapêuticas no tratamento de infecções por *A. baumannii*.
- As enzimas oxacilinases mais frequentes encontradas foram as OXA-23, seguidas de OXA-72.
- Sugerimos associações de determinantes de resistência com os CC. Como *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6)-Ib-cr* para o CC1 e *bla_{OXA-72}*, *dfrA1*, *sul2*, *floR*, *msrE*, *mphE*, *sat-2* para o CC79.
- Não foi possível encontrar associação entre os espectros detectados e os clones de *A. baumannii* pela metodologia MALDI-TOF.

REFERÊNCIAS

Abbas JE, Salimizand H, Hassanzadeh S, Ramazanzadeh R. AdeG efflux pump as the main Tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. Gene Report. 2020.

Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Kafil HS. *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. Infect Drug Resist. 2020.

Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, Hassan M, Hojabri Z. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Microb Drug Resist, 2013; 19 (4): 282-8.

Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochem. 2014.

Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, Pittet D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2011.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980;16;289(1036):321-31.

Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, de Araujo MRE, Lincopan N. High prevalence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2011.

Anvisa. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Maio, 2017.

Anvisa. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Maio, 2018.

Azucena E, Mobashery S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. Drug Resist Updat. 2001(2): 106-117.

Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of the *bla*_{TEM} gene and *bla*_{TEM}-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66:745–751.

Baptista MGFM. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, 2013.

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, Infect Genet Evol. 2020.

Barcellos TAF. Análise genômica e caracterização da suscetibilidade antimicrobiana em clones emergentes de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de diferentes instituições. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2021.

Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD, Hippeaux MC, Eveillard M, Dreyfuss D, Branger C. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France J Hosp Infect. 2010.

Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wishplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005.

Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JÁ, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by *pmrAB* Two-Component Regulatory System. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7): 3370–3379.

Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. 2013. ACS Chem Biol 8(1): 105-115.

Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect. 2013. 803-813.

Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015;13 (1): 42-51.

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

Bonomo RA, Sazbo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006 2:S49-56.

Bouvet P, Grimont P. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. 1986. Int J Syst Evol Microbiol 36:228-240.

Buermans HPJ, Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochim Biophys Acta . 2014; 1842(10):1932-1941.

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. Antimicrob Agents And Chemother. 2010; 54:969-976.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:1211-33.

Bush K, Bradford P. Epidemiology of B-lactamase-producing pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020.

Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]. Ann Inst Pasteur (Paris). 1954;722-728.

Brown S, Young HK, Amyes SG. Charactization of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect. 2005.

Cabrolie N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Identifies *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones. J Clin Microbiol. 2015; 53(4):1395-1398.

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 116 Clonal

Complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:2545- 7.

Campana EH, Carvalhães CG, Barbosa PP, Machado AMO, Paula AM, Gales AC. Evaluation of M.I.C.E.TM, Etest and CLSI broth microdilution methods for antimicrobial susceptibility testing of nosocomial bacterial isolates. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2011; 47; 157-164.

Candel FJ, Calvo N, Head J, Sánchez A, Matesanz A, Culebras E, Barrientos A, Picazo J. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23(2):103-108.

Carvalho KR, Gomes DBC, Genteluci GL, de Souza MJ, Zahner V, Maria Villas Bôas MHS. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Public Hospital in Brazil: a case report. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2015; Florianópolis-SC. Anais.

Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Dijkshoorn L, Gales AC. Old Clinical Isolates of *Acinetobacter seifertii* in Brazil Producing OXA-58. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:2589-2591.

Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017; 36, 415–420.

Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Bustamante Z, Seifert H, Gallego L, Higgins PG. *Acinetobacter baumannii* analysis by core genome MLST in two hospitals in Bolivia: endemicity of international clone 7 isolates (CC25). *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2019.

Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Krut O, Seifert H, Gallego L, Higgins PG. Mobile Genetic Elements Harboring Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Bolivia. *Front Microbiol.* 2020.

Chagas TP, Carvalho KR, Santos ICO, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 79(4): 468-472.

Chan J, Graves JA, Delit TH. Antimicrobiol treatment and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated pneumonia. *J Intens Care Med.* 2010.

Chin CY, Gregg KA, Napier BA, Ernst RK, Weiss DS. A PmrB-Regulated Deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 59:7911–7914.

Chopra S, Galande A. A fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii* without the quinolone resistance-determining region mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2011.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M02-A12. Wayne, PA, CLSI.

Coelho-Souza JN, Reis N, Martins LS, Martins AO, Menezes MG, Reis NO, Silva RC, Dias LW, Riley BM. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. Clin Microbiol Infect Dis. 2013. 241-244.

Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 2003. 52, 629–635.

Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, Huys G, Higgins PG, Seifert H, Lievens B., Roca I., Vila J. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66:4105-4111.

Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Périchon B. Screening and Quantification of the Expression of Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* with a Microarray. Antimicrob Agent Chemother. 2010.

Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2011.

Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol. 2003 Jul; 41(7): 3403–3406.

Day MR, Doumith M, do Nascimento V, Nair S, Ashton PM, Jenkins C, Dallman TJ, Stevens FJ, Freedman J, Hopkins KL, Woodford N, de Pinna EM, Godbole G. Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars *Typhi* and *Paratyphi*. J Antimicrob Chemother. 2017;73(2): 365-372.

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

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. J Med Microbiol. 2018.

de Azevedo FKSF, Dutra V, Nakazato L, Pepato MA, de Sousa ATHI, de Azevedo CCSF, Souto FJD. New sequence types of *Acinetobacter baumannii* in two emergency hospitals in the Central-West region of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019; 52: 1-3.

de Sá Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Moraes Junior 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;77:250-1.

de Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CRS, Campos TL, Rezende AM, Xavier DE, Leal NC, Neto OPM, Moraes MMC, Balbino TCL. High Frequency of OXA-253-Producing *Acinetobacter baumannii* in Different Hospitals in Recife, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2017.

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.

Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. 2014. 418-426.

Dijkshoorn L, Nemec A. The diversity of the genus *Acinetobacter* U. Gerischer (Ed.), *Acinetobacter Molecular Biology*, Caister Academic Press. 2008.

Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrili R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. Clin Microbiol Infect. 2011.

Dortet L, Bonnin RA, Bernabeu S, Escaut L, Vittecoq D, Girlich D, Imanci D, Fortineau N, Naas T. First occurrence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. Antimicrob Agents Chemother. 2016.

Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. Microbes Environ., 2011;101-112.

Dunne WM Jr, Westblade LF, Ford B. Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(8):1719-26.

Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. Clin Microbiol Infect. 2012;18(11):1097-103.

Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. OXA-51-like β -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2008.

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

Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. J. Clin. Microb. 2019; 57; (4)1390-18.

Ferreira JB, Rapoport PB, Sakano E, Kós AOA, Piltcher OB, Pignatari SSN, Pinheiro SD, Mocellin M. Eficácia e segurança de Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactam) e Amoxicilina/Clavulanato no tratamento das infecções de via aéreas superiores em adultos: um estudo multicêntrico, aberto e randomizado. Rev Bras Otorrinol. 2006;72(1)104-111.

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.

Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clin Infect. 2010; 51:79-84.

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.

Fonseca EL, Caldart RV, Freitas FS, Morgardo SM, Rocha LT, Santos RC, Vicente ACP. Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*OXA-72 and *bla*CTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. J Gl Antimicrob Resist. 2020.

Fortaleza CMB, Freitas FM, Lauterbach GP. Colonization pressure and risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical surgical intensive care unit in Brazil. J Infect Control. 2013; 41: 263-5.

Gaiarsa S, Biffignandi GB, Esposito EP, Castelli M, Joleey KA, Brisse S, Sasser D, Zarrilli R. Comparative analysis of the two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. Front Microbiol. 2019.

Gelbíčová T, Baráková A, Florianová M, Karpíšková R. Detection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* with the *mcr-4* gene. Klinicka Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi, 28 Feb 2019, 25(1):4-6.

Giarola LB, Baratieri T, Costa AM, Bedendo J, Marcon SS, Waidman MAP. Infecção hospitalar na perspectiva dos profissionais de enfermagem: um estudo bibliográfico. Cogitare Enferm. 2012;17 (1): 151-157.

Girija ASS, Priyadharsini JV, Paramasivam A. Plasmid-encoded resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by *dfrA1*, *dfrA5*, *sul1* and *sul2* among *Acinetobacter baumannii* isolated from urine samples of patients with severe urinary tract infection. J Global Antimicrob Resist. 2019.

Girlich D, Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014.

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(10): 2531-2532.

Gouvêa R, dos Santos FF, de Aquino MHC, Pereira VLA. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. Rev Bras Cienc Avic. 2015; 17: 1-10.

Grosso F, Carvalho S, Quinteira A, Ramos AP, Carvalho-Assef, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? J Antimicrob Chemother. 2010;66:62-65.

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.

Hameed F, Khan MA, Sarwar T, Bilal H, Rehman TU. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. Rev Soc Bras Med Trop. 2019.

Hamidian M, Hall RM. The AbaR antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 – structure, origin and evolution. Drug Resistance Updates. 2018.

Hamouda A, Amyes SGB. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother. 2004.

Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – an overview. Infect Drug Resist. 2018. 2321–2333.

Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacilinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(2): 233-238.

Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluorquinolone mechanism of action and resistance. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2016.

Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005 May;25(5):358-73.

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

Hornstein M, Sautjeau-Rostoker C, Péduzzi J, Vessières A, Hong LT, Barthélémy M, Scavizzi M, Labia R. Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 1997;153:333–9.

Isler B, Doi Y, Bonomo RA, Paterson DL. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. 2019.

Jolly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. CI Microbiol Infect. 2005; 11:868-873.

Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015; 2533-2548.

Kakuta N, Nakano R, Nakano A, Suzuki Y, Tanouchi A, Masui T, Horiuchi S, Endo S, Kakuta R, Ono Y, Yano H. A Novel Mismatched PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Rapid Detection of *gyrA* and *parC* Mutations Associated With Fluoroquinolone Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microb. 2019.

Kanamori H, Parobek CM, Weber DJ, van Duin D, Rutala WA, Cairns BA, Juliano JJ. Next-generation sequencing and comparative analysis of sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a large academic burn center. *Antimicrob Chemother*. 2016;60: 1249-1257.

Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother*. 2020.

Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:751-762.

Karampatakis T, Tsergouli K, Politi L, Diamantopoulou G, Iosifidis E, Antachopoulos C, Karyoti A, Sdougka M, Tsakris A, Roilides E. Polyclonal predominance of concurrently producing OXA-23 and OXA-58 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in pediatric intensive care unit. *Molecular biology reports*. 2019.

Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*. 2012;15(4): 237-247.

Kempf M, Rolain JM, Azza S, Diene S, Jolly-Guillou ML, Dubourg G, Colson P, Papazian L, Richet H, Fournier PE, Ribeiro A, Raoult D. Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. *J Pathology Microbiol Immunol*. 2012.

Kimura Y, Harada K, Shimizu T, Sato T, Kajino A, Usui M, Tamura Y, Tsuyuki Y, Miyamoto T, Ohki A, Watari M. Species distribution, virulence factors and antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. Isolates from dogs and cats: a preliminary study. *Microbiol Immunol*. 2018; 62: 462–466.

Kon H, Schwartz D, Temkin E, Carmeli Y, Lellouche J. Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test. *BMC Microbiol*. 2020.

Kramer AI, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:130.

Krizova L, Dijkshoorn L, Nemec A. Diversity and Evolution of AbaR Genomic Resistance Islands in *Acinetobacter baumannii* Strains of European Clone I. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011.

Kurihara MNL, Sales RO, Silva KE, Maciel WG, Simionatto S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Med Trop*. 2020.

Kwong JC, McCallum N, Sintchenki V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. 2015 Apr; 47(3): 199–210.

Labby KJ, Garneau-Tsodikova S. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. *Future Med Chem*. 2013 Jul; 5(11): 10.4155/fmc.13.80.

Lashinsky JN, Henig O, Pogue JM, Kaye KS. Minocycline for the treatment of multidrug and extensively drug-resistant *A. baumannii*: revivew. 2017. Infect Dis Ther; 6: 199-211.

Leal NC, Campos TL, Rezende AM, Docena C, Marques CLM, de Sá-Cavalcanti FL, Wallu GL, Rocha IV, Cavalcanti CLB, Veras DL, Alves LR, Andrade-Figueiredo M, Barros MPS, Almeida AMP, Morais MMC, Balbino TCL, Xavier DE, Neto OP. Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. Front Microbiol. 2020.

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 YT, Turton JF, Chen TL, Wu RC, Chang WC, Fung CP, Chen CP, Cho WL, Huang LY, Siu LK. First identification of *bla*_{OXA-51-like} in *non-baumannii* *Acinetobacter* spp. J. Chemother. 2009.

Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Emergence of carbapenem-resistant *non-baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*_{OXA-51-like} gene that is intrinsic to *A. baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2012.

Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, Kawai K. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2014;20(5):416-23.

Lescat M, Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Performance of the Rapid Polymyxin *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Tests for Colistin Susceptibility Testing. Microb Drug Resist. 2018;25:520-3.

Lessel EF. International committee on nomenclature of bacteria subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 1971;21:213–214.

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, Vila J. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. J Emerg Micr Infect. 2018.

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): 1168-1176.

Lin F, Xu Y, Chang Y, Liu C, Jia X, Ling B. Molecular Characterization of Reduced Susceptibility to Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2017.

- Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. 2006.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol. 2012; 251-364.
- Liu YH, Kuo SC, Lee YT, Chang ICY, Yang SP, Chen TL, Fung CP. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in *gyrA* and *parC* associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genome species 13TU. J Microbiol Immunol Infect. 2012; 108-12.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Infect Dis. 2015.
- Liu L, Shen P, Zheng B, Yu W, Ji J, Xiao Y. Comparative Genomic Analysis of 19 Clinical Isolates of Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2020.
- Lopes BS, Amyes SGB. Role of ISAba1 and ISAba125 in governing the expression of *bla_{ADC}* in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. J Med Microbiol. 2012.
- Ma F, Shen C, Zheng X, Liu Y, Chen H, Zhong L, Liang Y, Liao K, Xia Y, Tian G-B, Yang Y. 2019. Identification of a novel plasmid carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. Antimicrob Agents Chemother. 2019. 63:e00133-19.
- Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology - a technical review. Rev Inst Adolfo Lutz. 2005.
- Magiorakos AP, Sirinivasan 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: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3), 268-81.
- Maia ECP, Silva, PP, Almeida WB, Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R, Guerra W. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. Quím. Nova, 2010; 700-706.
- Makke G, Bitar I, Salloum T, Panossian B, Alousi S, Arabaghian H, Medvecky M, Hrabak J, Merheb-Ghoussoub S, Tokajian S. Whole-genome-sequence-based characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* hospital outbreak. 2020.
- Mammeri H, Poirel L, Mangeney N, Nordmann P. Chromosomal Integration of a Cephalosporinase Gene from *Acinetobacter baumannii* into *Oligella urethralis* as a Source of Acquired Resistance to β -lactams. Antimicrob Agents Chemother, 2003.
- Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enf Infec Microbiol Clin. 2003. 42-55.
- Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodríguez-Baño J, Bou G, Cisneros JM, Pachón J, Martínez-Martínez L, Vila J. Prevalencia de los genes *tetA* y

tetB como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc MicrobiolClin*, 2006.

Martins AF, Barth AL. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. *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; 20:378-380.

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.

Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, Cacci LC, Iavarone AT, McGann P, Riley LW, Moreira BM. A novel plasmid-encoded *mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *J Antimicrob Chemother*. 2020.

Mathlouthi N, Iamine YB, Somai R, Bouhalila-Besbes S, Bakour S, Rolain JM, Chouchani C. Incidence of OXA-23 and OXA-58 carbapenemases coexpressed in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*. 2018.

Mcdermott PF, Tyson GH, Kabera C, Chen Y, Li C, Folster JP, Ayers SL, Lam C, Tate HP, Zhao S. Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2016;60(9): 5515-5520.

Melles DC, Leeuwen WB, Snijders SV, Horst-Kreft D, Peeters JK, Verbrugh HA, Belkuma A. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Meth*. 2007.

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.

Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, Carolis E, Vella A, Cacioni A, Buzi S, Nardelli E, Bistoni F, Sanguinetti M, Vecchiarelli A. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013.

Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas – revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras*. 2009.

Merkier AK, Centrón D. bla-OXA-51 type B-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006.

Meyer G, Picoli SU. Phenotypes of beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* from emergency hospital of Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab*. 2011.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM.. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):727-37.

Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:55-71.

Morris FC, Dexter C, Kostoulas X, Uddin MI, Peleg AY. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019.

Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. Isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2012.

Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Álvarez-Lerma F, Montero M, Gómez J, Horcajada JP, Vila J, Roca I. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(10): 5155–5157.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: a review. *Front Microbiol.* 2019; 10:539.

Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional Analysis of Insertion Sequence ISAbal, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2009.

Narciso AC, Martins WMBS, Cayô R, de Matos AP, Santos SV, Ramos PL, da Cruz JB, Gales AC. Detection of OXA-58-Producing *Acinetobacter seifertii* recovered from a Black-Necked Swan at a Zoo lake. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12): 1360-17.

Narciso AC, Martins WBMS, Almeida LGP, Cayô R, Santos SV, Ramos PL, Lincopan N, Vasconcelos ATR, Gales AC. Healthcare-associated carbapenem-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* of the clonal complex CC79 colonizing migratory and captive aquatic birds in a Brazilian Zoo. *Science of The Total Environment.* 2020.

Nejad SB, Allegranzi B, Syed SB, Ellis B, Pittet D. Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2011;89:757–765.

Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* 2004.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65:934-42.

Nigro SJ, Hall RM. Does the intrinsic oxaAb (*bla*_{OXA-51-like}) gene of *Acinetobacter baumannii* confer resistance to carbapenems when activated by ISAbal? *Journal Antimicrob Chemother.* 2018; 3518–3520.

Núñez Quezada T, Rodríguez CH, Cañarte GC, Nastro M, Yarhui NB, Dabos L, Mosquera YA, Moreira NP, Famiglietti A. Outbreak of *bla*_{OXA-72}-producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Chemother.* 2016. 321-324.

Olaitan AO, Morand SE, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.*, 2014. 2-16.

Pagano M, Rocha L, Sampaio JL, Martins AF, Barth AL. Emergence of OXA72-producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to High-Risk Clones (CC15 and CC79) in Different Brazilian States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017;38:252-254.

Pagano M, Nunes LS, Niada M, Barth A, 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). *Microbial Drug Resistance.* 2019.

Park S, Lee KM, Yoo YS, Yoo JS, Yoo JI, Kim HS, Lee YS, Chung GT. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health Resear Perspect.* 2011.

Pasternak J. New methods of microbiological identification using MALDI- TOF. *Einstein, São Paulo.* 2012;10(1):118-119.

Paton R, Miles RS, Hood J, and Amyes SGB. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993;2:81-88.

Peleg AY, Paterson DL. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. *Intern Med J.* 2006; 36:479-82.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:538-582.

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA, Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51:3471–3484.

Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Bardé J. Functional Characterization of AbaQ, a Novel Efflux Pump Mediating Quinolone Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018.

Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice.* 3rd Edition. ASM Press, Washington. 2016.

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.

Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:826-836.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2007.

Poirel L, Naas T e Nordmann P. Diversity, epidemiology e genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:24-38.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012. 12(5), 883–893.

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol*. 2017. 30:557–596.

Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R. Single-Locus-Sequence-Based Typing of *bla*_{OXA-51-like} Genes for Rapid Assignment of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates to International Clonal Lineages. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(5): 1653-1657.

Possebon MI, Camargo EA. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. *Rev Bras Med*. 2003;60(6):378-382.

Post and R.M. Hall, AbaR5, a large multiple antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*., *Antimicrob. Agents Chemother*. 53 (2009), pp. 2667-2671.

Potron A, Bour M, Triponney P, Muller J, Koebel C, Bonnin RA, Plésiat P. Sequential emergence of colistin and rifampicin resistance in an OXA-72- producing outbreak strain of *Acinetobacter baumannii*. *Internat J Antimicrob Agent*. 2019.

Portaria Nº 2616, de 12 de maio de 1998. Ministério do Estado da Saúde.

Püntener-Simmen S, Zurfluh K, Schmitt S, Stephan S, Nüesch-Inderbinen M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Isolates Belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB) Complex Isolated From Animals Treated at a Veterinary Hospital in Switzerland. *Front. Vet. Sci*. 2019. 5;6:17.

Ramírez MS, Piñeiro S, Centrón D. Novel Insights about Class 2 Integrins from Experimental and Genomic Epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010.

Ramírez MS, Adams MD, Bonomo RA, Centrón D, Tolmasky ME. Genomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* A118 by Comparison of Optical Maps: Identification of Structures Related to Its Susceptibility Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012.

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 2014.

Rocha L, Pagano M, Campos JC, Sampaio JLM, Martins AF, Barth AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. *J Bras Patol Med Lab*. 2017 Jan; 53(6): 358-361.

Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Arg Microbiol*. 2018.327-333.

Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2017 (In press). doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.001.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011; 52:1138-1143.

Sadouki Z, Day MR, Doumith M, Chattaway MA, Dallman TJ, Hopkins KL, Elson R, Woodford N, Godbole G, Jenkins C. Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of *Shigella sonnei* isolated from cases of diarrhoeal disease in England and Wales, 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(9): 2496-2502.

Salgado-Camargo AD, Jaimes SC, Rios RMG, Lozano LF, Pacheco LA, Sanchez JS, Oseguera AP, Volkow P, Ramírez SC, Cevallos MA. *Front Microbiol*. 2020.

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): 1072-1079.

Sarikhani Z, Nazari R, Rostami MN. First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2017.

Saranathan R, Sudhakar P, Karthika RU, Singh SK, Shashikala P, Kanungo R, Prashanth K. Multiple drug resistant carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* isolates harbours multiple R-plasmids. *Indian J Med Res*. 2014.

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(9): 4328-4335.

Sertcelik A, Baran I, Akinci E, Mumcuoglu I, Bodur H. *Microb Drug Resist*. 2020.429-433.

Sevillano E, Fernández E, Bustamante Z, Zabalaga S, Rosales I, Umaran A, Gallego L. Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. *J Med Microbiol*. 2012.

Sheikhalizadeh V, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, 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 Feb; 23(2):74-79.

Shlaes DM, Bradford PA. Antibiotics—from there to where? *Pathog. Immun*. 2018.

Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary Study of Colistin versus Colistin plus Fosfomycin for Treatment of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014.

Singh AK, Girija ASS, Priyadharsini JV, Paramasivam A. Frequency of chromosomally encoded *gyrA* and *parC* genetic determinants of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Pharm Res Int*. 2020; 32(16): 18-24.

Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol*. 2015.

Souza ES, Belei RA, Carrilho CMDM, Matsuo T, Yamada-Ogatta SF, Andrade G, Perugini MRE, Pieri FM, Dessunti EM, Kerbauy G. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. *Texto & Contexto – Enfermagem*. 2015; 24(1):220-228.

Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol*. 1991. 176–183.

Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes W. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009.

Suárez C, Gudíol F. Antibióticos betalactámicos. *Enf Inf Microbiol Clin*. 2009.

Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010.

Tan SYT, Chua SL, Liu Y, Hoiby N, Andersen LP, Giuskov M, Song Z, Yang L. Comparative Genomic Analysis of Rapid Evolution of an Extreme-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone. *Genome Biol Evol*. 2013.

Tavares LCB, de Vasconcellos FM, Sant'Ana DA, Tiba-Casas MR, Camargo CH. *Acinetobacter baumannii* ST317 can be identified with Martins' trilocus sequence-based multiplex-PCR. *Infect Genet Evol*. 2018;58:251-252.

Tao H, Ran W, Dejun L, Walsh TR, Zhang R, Lv Y, Ke Y, Ji Q, Wei R, Liu Z, Shen Y, Wang G, Sun L, Lei L, Lv Z, Li Y, Pang M, Wang L, Sun Q, Fu Y, Song H, Hao Y, Shen Z, Wang S, Chen G, Wu C, Shen J, Wang Y. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat Microbiol*. 2019.

Tavares LCB, Vasconcellos FM, Sousa WV, Rocchetti TT, Mondelli AL, Ferreira AM, Montelli AC, Sadatsune T, Tiba-Casas MR, Camargo CH. Emergence and Persistence of High-Risk Clones among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian Teaching Hospital. *Front Microbiol*. , 2019.

Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pitt CP, Barth AL. First Report of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter nosocomialis* Isolates Harboring ISAb1-*bla*_{OXA-23} Genes in Latin America. *J Clin Microbiol*. 2013.

Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-head comparison of two Multi-locus Sequence Typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One*. 2016.

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, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufman 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.

Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007;13: 807–815.

Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(3):430-50.

Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiense 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, Dalben MF, Guzman RD, Cayô R, Moraes R, Santos SA, Martins WM. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXAcarbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;4:382-5.

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

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. 2017b; 66(1):98-102.

Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. J Med Chem, 2010; 53(5), 1898–1916.

Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:2757-2759.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007;59:1210-1215.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol. 2011; 49(3): 875–882.

Wang L, Liu D, Lv Y, Cui L, Li Y, Li T, Song H, Hao Y, Shen J, Wang Y, Walsh TR. Novel plasmid-mediated tet(X5) gene conferring resistance to tigecycline, eravacycline, and omadacycline in a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2020.

Wang S, Gao X, Gao Y, Li Y, Cao M, Xi Z. Tetracycline resistance genes identified from distinct soil environments in China by functional metagenomics. Front. Microbiol. 2017.

Wang P, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, Doi Y. Contribution of the TetB Efflux Pump to Minocycline Susceptibility among Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains. J Antimicrob Chemother. 2017.

Wang X, Qin LJ. A review on *Acinetobacter baumannii*. J Acute Dis. 2019; 8:16-20.

Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72- producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. J Antimicrob Chemother. 2011a;66:452-454.

Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochem Cytobiol. 2008; 46 (3): 257-67.

Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2003.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents. 2006; 27:351-353.

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.

WHO, World Health Organization. Health care-associated infections Fact Sheet. 2014. Disponível em: http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Acesso em: 15 ago. 2018.

WHO, World Health Organization. Health care-associated infections Fact Sheet. 2017. Disponível em: http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Acesso em: 20 nov. 2018.

Wu W, He Y, Lu Y, Wu J, Liu Y. Transition of blaOXA-58-like to blaOXA-23-like in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Southern China: An 8-year Study. PloS one.2015.

Xu CF, Bilya SR, Xu W. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. New Micr New Infec. 2019.

Yassine I, Rafei R, Osman M, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M. Plasmid-mediated quinolone resistance: mechanisms, detection, and epidemiology in the Arab countries. Infec genet evol. 2019.

Yang H, Hu L, Liu Y, Ye Y, Li J. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in China. J. Chemother. 2016.

Zaki MES, Elker NA, Mofreh M. Molecular Study of Quinolone Resistance Determining Regions of *gyrA* Gene and *parC* Genes in Clinical Isolates of *Acintobacter baumannii* Resistant to Fluoroquinolone. Open Microbiol. 2018.

Zander R, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of bla_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 2007;60 (6):1206–1215.

Zhang Y, Chen F, Sun E, Ma R, Qu C, Ma L. In vitro antibacterial activity of combinations of fosfomycin, minocycline and polymyxin B on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Exp Therapeut Med*. 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Artigos publicados durante o período de pós graduação.

Bueno MS, Freire MP, Cunha MPV, Barcellos TAF, Bertani AMJ, Santos CA, Chimara E, Nagamori FO, Takagi EH, Costa SF, Abdala RKLIE, 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.

Tavares LCB, Cunha MPV, de Vasconcellos FM, Bertani AMJ, de 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. Microb Drug Resist. 2020;26(11):1399-1404.

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 characterization of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79, and CC25, Internat J Antimicrob Agents. 2020.

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, Infect Genet Evolut. 2020.

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 , 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 b-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 % 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)-Ia* and *aac(3)-IIa*]; *strA* and *strB* genes, which confer resistance to streptomycin, were also detected. Resistance to b-lactams was also mediated by enzymatic mechanisms, nominally due to the presence of the carbapenem-hydrolysing class D b-lactamase oxacillinase OXA-23, whose gene was inserted downstream of one copy of *ISAbal* 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 tetra- cyclines 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)	aac(6 ^b)-Ia aac(3)-IIa	—
gentamicin >8 (R)		
tobramycin >8 (R)		
netilmicin ^a >256 (R)		
Quinolones		
ciprofloxacin >2 (R)	—	gyrA (S83L)
levofloxacin 8 (R)		parC (S80L)
b-Lactams ^a		
ampicillin/ sulbactam >64/32 (R)	bla _{OXA-23} bla _{TEM-1B}	—
cefepime >16 (R)		
cefotaxime >32 (R)		
ceftazidime >16 (R)		
ceftriaxone ^b >32 (R)		
doripenem >4 (R)		
imipenem >8 (R)		
meropenem >8 (R)		
piperacillin/ tazobactam >64/4 (R)		
ticarcillin/ clavulanate >128/2 (R)		
Polymyxins ^c		
polymyxin B 16 (R)	—	pmrB (D79E)
colistin >4 (R)		lpxD (A273G)
Tetracyclines		
tetracycline ^b 16 (R)	tet(B)	—
minocycline ^c 32 (R)		
doxycycline 16 (R)		
Folate pathway antagonist		
trimethoprim/ sulfamethoxazole >76/4 (R)	sul2	—

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.

described the genome of an MDR ST15 *A. baumannii* isolate (CCBH5233) isolated in Rio de Janeiro in 2009. Comparing the resistance 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

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

- 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.

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 *sull*, *aac*(6 ϕ)-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- β -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* DH10b 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 mg/mL; Sigma Aldrich) or cefotaxime (1, 2 mg/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 break-points were applied (susceptible: £2 mg/mL; resistant: >8 mg/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 mL 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), *sulI* (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 *sulI*, *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; *bfpR*, 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')-31, 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

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 Harummy 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 Entericas e Infecções por Patógenos Especiais, Avenida Dr Arnaldo, 351 - 9º Andar, Pacaembu, 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 *ApaI*-digested pulsed-field gel electrophoresis (*ApaI*-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.genomicpidemiology.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%); *dfrA1* (*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 1
Antimicrobial 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 2
Antimicrobial 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^f)-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aph(3^f)-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 3

Distribution 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>dfpA1</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, *aac*A4 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 *dfr*A1 and *sul*2 genes, which encode resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole, respectively. The resistome *str*A, *str*B, *aad*A1, *aad*B, *aph*(3)-VIa, *ISAba1-ampC*, *bla*_{TEM-1A}, *sul*2, *flo*R and *dfr*A1 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 nation-wide 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* 2018;52:1138–43. doi:10.1093/cid/cir120.
- Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Veiga Kiffer CR, Barth AL, Carneiro ICDRS, Giambardino 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, Lincopan 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 macromolecule structures as strategies for the adaptation of *Acinetobacter baumannii* CC104^P/CC15^P 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, Leekitcharoenphon 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, Bhui 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, Cavalini 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 β-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 TnapA6-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 *ISAbi1* 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).

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 Entéricas 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 (Mari-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 × 50 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 massband 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 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 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.AC1AD0304>). 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 (Sangui-netti 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 nucleotide 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., Sukiennik, 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>.