

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Análise da dinâmica populacional e dos determinantes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da cidade de  
Porto Alegre

MARIANA PAGANO PEREIRA

PORTO ALEGRE, 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Análise da dinâmica populacional e dos determinantes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da cidade de  
Porto Alegre

Tese apresentada por **Mariana Pagano Pereira** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Co-Orientadora: Prof. Dra. Andreza Francisco Martins

Porto Alegre, 2016

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30/08/2016 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dra. Beatriz Meurer Moreira

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

#### CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Mariana Pagano  
Análise da dinâmica populacional e dos determinantes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da cidade de Porto Alegre / Mariana Pagano Pereira. -- 2016.  
129 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.  
Coorientadora: Andreza Francisco Martins.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Acinetobacter*. 2. Carbapenemases. 3. Resistência Bacteriana. 4. MLST. 5. Tipagem Molecular. I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Martins, Andreza Francisco, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas - UAMP do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (10-0026-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Projeto Universal 14/2012 – Processo 473752/2012-3). O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), além de bolsa PDSE para realização de estágio no exterior com duração de seis meses.



*Aos meus pais, Bruno e Miriam.*

**“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”**

Louis Pasteur





## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador e amigo, Prof. Afonso Barth, pela confiança, pelo carinho, por todas as palavras de incentivo e pelas experiências compartilhadas em nossos cafés e conversas matinais. Agradeço imensamente todas oportunidades oferecidas, por acreditar na minha capacidade e no meu trabalho, o que tornou possível minha ida ao exterior para o doutorado sanduíche. Obrigada por sempre ser um exemplo de profissionalismo, ética e amor à profissão.

À minha professora e co-orientadora, Andreza Martins pela contribuição neste trabalho, pela confiança e oportunidades oferecidas.

À todos os colegas do LABRESIS pela convivência diária, pela troca de experiências e colaboração ao longo desta jornada.

Aos alunos de iniciação científica Manoella Pugliesi, Monica Tonello, Diego Bertolini e Marina Niada que se empenharam para realização deste trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Franciéli, Cibele e Vanessa pela colaboração em alguns experimentos, pelo constante incentivo e apoio, por compartilhar comigo expectativas e angústias, e principalmente, pela amizade sincera.

À Tanise, pela ajuda em diversos experimentos.

À Lisiane Rocha e ao Dr. Jorge Sampaio pelas parcerias durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga e colega de laboratório Luciana pelo empenho, discussão de resultados, por compartilhar frustrações e pela grande colaboração para o desenvolvimento este trabalho.

Ao professor Alexandre Zavascki pelas contribuições científicas ao longo desta jornada.

À minha grande amiga Veronica Conrad por estar do meu lado durante meu estágio na Suíça, sempre confiando na minha capacidade, me apoiando, e me fazendo enxergar as coisas de uma maneira positiva.

Ao Everaldo, do Centro de Pesquisa Experimental pela amizade, pelos cafés e por toda presteza durante a execução deste trabalho.

Aos meus queridos colegas e amigos da Unidade Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Rodrigo Cayô, pela ajuda nos experimentos de MLST.

Ao Prof. Patrice Nordmann e ao Dr. Laurent Poirel, meus supervisores de estágio no exterior, pela paciência, pela grande oportunidade e credibilidade, e principalmente por terem me ensinado muito sobre como fazer ciência.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim, agradeço à minha família, principalmente aos meus queridos pais, que nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação e sempre transmitir confiança e compreensão em todos os caminhos que eu decidi seguir. Agradeço também ao meu irmão Daniel, à minha querida amiga e cunhada Francine, e à minha dinda Rosangela, por sempre estarem comemorando cada vitória ao meu lado.

## RESUMO

*Acinetobacter baumannii* é considerado um dos patógenos de maior importância clínica atualmente, sendo responsável por uma variedade de infecções nosocomiais como, bacteremias, infecções no trato urinário, pneumonias associadas a ventilação mecânica, meningites secundárias e infecções em feridas. Desde a última década o tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. vem sendo dificultado pela emergência de cepas multirresistentes. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a dinâmica populacional e as características moleculares envolvidas na resistência de *Acinetobacter* spp. Foram avaliados isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de seis hospitais da cidade de Porto Alegre coletados entre janeiro de 2013 e março de 2014. A espécie *Acinetobacter baumannii* foi identificada pela presença do gene *blaOXA-51*, além de PCR multiplex para o gene *gyrB*. Carbapenemases (*blaNDM*, *blaOXA-23-like*, *blaOXA-24/40-like*, *blaOXA-58-like* e *blaOXA-143-like*), além dos integrons de classe 1 e 2 foram pesquisados por PCR. Um total de 524 isolados de *Acinetobacter* spp. foram coletados, e a maioria (487/92,9%) foram identificados como *A. baumannii*, seguidos pelas espécies *A. nosocomialis* (9/1,7%), *A. pittii* (3/0,6%), *A. calcoaceticus* (3/0,6%) e por fim, 22 (4,2%) isolados não pertenciam ao complexo *A. baumannii-calcoaceticus*. Quanto ao perfil de sensibilidade, 83% dos isolados demonstraram não ser sensíveis aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Dos isolados de *A. baumannii*, 429 (88,1%) continham o gene *blaOXA-23*, além disso, foram observados dois isolados de *A. nosocomialis* contendo o gene *blaOXA-23*. Foi possível identificar dois isolados de *A. baumannii* produtores de *blaOXA24/40* (0,8%) pela primeira vez na região Sul do país. A análise do gene por sequenciamento caracterizou como sendo a variante *blaOXA-72*, e a tipagem por MLST caracterizou os isolados como pertencentes a ST730 (CC79). Também foram analisados por MLST, isolados produtores de OXA-72 do estado de São Paulo e do Paraná. A análise dos dados demonstrou que estes isolados estão associados aos complexos clonais epidêmicos CC15 e CC79.

A pesquisa para o gene *bla*NDM foi positiva para um isolado de *A. pittii*, sendo o primeiro isolado de *Acinetobacter* não *baumannii* produtor de NDM-1 no Brasil. A análise do contexto genético de *bla*NDM-1 demonstrou a presença de *ISAbal25 upstream* ao gene, além disso, o gene demonstrou estar localizado no cromossomo da bactéria. Foi observada uma maior prevalência de integrons de classe 2 nos isolados avaliados (134/25,5%), quando comparada aos integrons de classe 1 (72/13,7%). Raros (2/0,4%) isolados apresentaram ambas as classes de integrons. Um total 244 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram submetidos à tipagem por REP-PCR, que demonstrou a presença de 20 grupos clonais entre os isolados analisados. Isolados de diferentes grupos clonais foram selecionados para a tipagem por MLST. Com o objetivo de realizarmos uma análise longitudinal dos clones circulantes desde o primeiro surto de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) na cidade de Porto Alegre, também foram selecionados para análise por MLST isolados de *A. baumannii* pertencentes ao nosso banco de dados com diferentes perfis clonais, coletados entre 2007 e 2008. Através da análise dos dados gerados pelo MLST no banco de dados do Instituto Pasteur, foram descritas 13 novas STs: ST883 (CC32), ST884 (CC221), ST885 (CC79), ST886, ST887, ST888, ST889 (CC464), ST892 (CC15), ST899, ST902 (CC1), ST903 (CC79), ST904 (CC15) e ST905 (CC32). A avaliação da dinâmica populacional de *A. baumannii* nos dois períodos avaliados demonstrou a permanência de isolados pertencentes aos complexos clonais CC15 e CC79 desde o período do primeiro surto de CRAB da cidade de Porto Alegre até o ano de 2014, demonstrando a capacidade desses clones de se manter por longos períodos no ambiente hospitalar. Além disso, estes CCs apresentaram uma elevada prevalência durante o primeiro período avaliado (2007-2008). Este dado que nos permite inferir que o primeiro surto de CRAB produtor de OXA-23 da cidade de Porto Alegre foi relacionado a disseminação de CC15 e CC79.

**Palavras-chave:** *Acinetobacter baumannii*; MLST; carbapenemases

## ABSTRACT

### **Analysis of the population dynamics and the determinants involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. isolates from the city of Porto Alegre**

*Acinetobacter baumannii* is considered one of the main pathogens of clinical importance currently, being responsible for a wide range of nosocomial infections such as, bacteremias, urinary tract infections, ventilator-associated pneumonia, secondary meningitis and wound infections. Since the last decade the treatment of these infections has been impaired by the emergence of multiresistant strains. In this context, the aim of this study was to determine the population dynamic and the molecular characteristics involved in *Acinetobacter* spp. resistance. A total of 524 *Acinetobacter* spp. isolates were collected from six Porto Alegre hospitals from January 2013 to March 2014. *A. baumannii* species were identified by the presence of *bla*OXA-51 gene and by the *gyrB* multiplex PCR. Carbapenemase genes (*bla*NDM, *bla*OXA-23-like, *bla*OXA-24/40-like, *bla*OXA-58-like and *bla*OXA-143-like) as well as class 1 and 2 integrons were investigated by PCR. As expected, the majority (487/92.9%) of isolates were identified as *A. baumannii*, followed by *A. nosocomialis* (9/1.7%), *A. pittii* (3/0.6%), and *A. calcoaceticus* (3/0.6%). A total of 22 (4.2%) isolates were not identified as *A. baumannii-calcoaceticus* complex. Analysis of the susceptibility profile demonstrated that 83% of the isolates were not susceptible to carbapenems (imipenem e meropenem). Among the *A. baumannii* isolates, 429/487 (88.1%) presented *bla*OXA-23 gene. Two *A. nosocomialis* isolates also presented the *bla*OXA-23 gene. We also found, for the first time in Southern Brazil, two *A. baumannii* isolates containing *bla*OXA24/40 (0.8%). The sequencing of *bla*OXA24/40 identified the variant *bla*OXA-72, and MLST analysis characterized both isolates as ST730 (CC79). In addition, OXA-72-producing *A. baumannii* isolates from the states of São Paulo and Paraná were analyzed by MLST. Data analysis

demonstrated that the isolates were associated to the clonal complexes CC15 and CC79. The screening of *bla*NDM gene was positive for an *A. pittii* isolate. Therewith, in the present study we described for the first time a *Acinetobacter non-baumannii* producing NDM-1 in Brazil. Analysis of the genetic environment of *bla*NDM-1 gene demonstrated the presence of *ISAba125* upstream of the gene and that the gene was chromosome-located in *A. pittii*. It was observed an increased prevalence of class 2 integrons (134/25.5%) compared to class 1 integrons (72/13.7%). Only a few isolates presented both classes (2/0.4%). A total of 244 carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates were typed by REP-PCR, which demonstrated the presence of 20 clonal groups. Isolates belonging to different clonal groups were selected for MLST typing. In order to conduct a longitudinal analysis of circulating clones from the first CRAB outbreak in the city of Porto Alegre, we also selected *A. baumannii* isolates with different clonal profiles collected between 2007 and 2008. According to MLST database from Pasteur Institute, we identified 13 new STs: ST883 (CC32), ST884 (CC221), ST885 (CC79), ST886, ST887, ST888, ST889 (CC464), ST892 (CC15), ST899, ST902 (CC1), ST903 (CC79), ST904 (CC15) and ST905 (CC32). The analysis of *A. baumannii* population dynamics in the two periods of the study demonstrated the persistence of the clonal complexes CC15 and CC79 from the first CRAB outbreak in Porto Alegre city, up to the year of 2014. Besides, these CCs presented a high prevalence during the first period (2007-2008) evaluated. These data allow us to infer that the first CRAB OXA-23-producing outbreak in Porto Alegre city was related to the dissemination of CC15 and CC79.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, MLST, carbapenemases

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADC**- *Acinetobacter derived cephalosporinase*

**ARI-1** - *Acinetobacter resistant imipenem*

**CC**- *Clonal complex* (Complexo clonal)

**CHDL** - *Carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase*

**CRAB** – *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos)

**IS** - *Insertion Sequence*

**KPC** - *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

**M $\beta$ L** - *Metalo-beta-lactamase*

**MDR** - *Multidrug resistant*

**MIC**- *Minimal inhibitory concentration* (Concentração inibitória mínima)

**MLST**- *Multilocus sequence typing*

**NDM**- *Nova Delhi Metalo-beta-lactamase*

**ORF**- *Open reading frame* (sequência aberta de leitura)

**OXA** – *Oxacilinase*

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**PFGE** - *Pulsed field gel electrophoresis*

**ST**- *Sequence type*

**UTI** - *Unidade de Terapia Intensiva*





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3. REVISÃO DO TEMA</b> .....	23
3.1 Gênero <i>Acinetobacter</i> sp. ....	23
3.2 Epidemiologia do gênero .....	23
3.3 Infecções causadas por <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	24
3.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	25
3.4.1 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos .....	26
3.4.1.1 Resistência aos carbapenêmicos .....	27
3.4.1.2 $\beta$ -lactamases .....	27
3.4.1.2.1 Metallo- $\beta$ -lactamases .....	29
3.4.1.2.2 Oxacilinasas .....	30
3.5 Elementos Genéticos Móveis .....	36
3.5.1 Ilhas de resistência .....	36
3.5.2 Transposons .....	37
3.5.3 Sequências de inserção .....	38
3.5.4 Integrons .....	39
3.6 Tipagem Molecular .....	41
3.6.1 Métodos de tipagem baseados na reação de PCR .....	41
3.6.2 Tipagem molecular por macro-restrição seguida de PFGE .....	42
3.6.3 <i>Multilocus sequence typing</i> - MLST .....	43
3.7 Epidemiologia global de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	45
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	47
4.1 MANUSCRITO I - Emergence of NDM-1 producing <i>Acinetobacter pittii</i> in Brazil .....	49
4.2 MANUSCRITO II - Emergence of <i>Acinetobacter baumannii</i> ST730 carrying the <i>bla</i> OXA-72 gene in Brazil .....	53
4.3 MANUSCRITO III - Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	57
4.4 MANUSCRITO IV- Emergence of OXA-72-producing <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates belonging to high-risk clones (CC15 and CC79) in different Brazilian states .....	67
4.5 MANUSCRITO V- Comparative analysis of carbapenem resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> population structure in Southern Brazil: from the first outbreak (2007-2008) to the endemic rates (2013-2014) .....	79
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	67
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	99
<b>7. FIGURAS</b> .....	101
<b>8. TABELA</b> .....	105
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	107
<b>10. ANEXOS</b> .....	125
<b>11. BIOGRAFIA</b> .....	127



## 1. INTRODUÇÃO

*Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista associado a diversas infecções nosocomiais, incluindo pneumonias, meningites secundárias, infecções urinárias e bacteremias, contudo, seu principal papel está relacionado à pneumonia nosocomial, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI). Esse microrganismo apresenta uma grande capacidade de se disseminar, além de adquirir e acumular novos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Devido a essas propriedades, numerosos casos de *A. baumannii* multirresistente têm sido relatados em diversos países, inclusive no Brasil.

Os antimicrobianos carbapenêmicos são considerados a melhor opção no tratamento de infecções causadas por espécies de *Acinetobacter* spp. Entretanto, desde os anos 2000, tem sido descrito um aumento significativo na incidência de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAb), tornando ainda mais escassas as opções de tratamento. O primeiro surto causado por *A. baumannii* multirresistente no Brasil foi em 2003 na cidade de Curitiba. Em Porto Alegre, o primeiro surto surgiu cinco anos após, em 2007, e atualmente pode-se considerar que existe uma endemia de *A. baumannii* multirresistente em todas as instituições de saúde da cidade. Dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde publicados no boletim de 2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária demonstraram níveis de 79,8% de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes em todo o país.

A resistência aos carbapenêmicos pode ser mediada por diversos mecanismos como alterações na permeabilidade de membrana, superexpressão de bombas de efluxo (AdeABC e AdeDE), entretanto é principalmente associada a produção de carbapenemases de classe D (Oxacilinas) e menos frequentemente, de classe B (metaloenzimas).

Sabe-se atualmente que, com a maior circulação mundial de pessoas, a disseminação de isolados de *Acinetobacter* spp. contendo novos genes de resistência será um problema inevitável. Com isso, a pesquisa desses genes é de grande importância tanto para a caracterização da epidemiologia local, quanto para a aplicação de uma melhor terapêutica no tratamento destas infecções.

A escassez de novas opções terapêuticas disponíveis no mercado, torna a disseminação de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos um grave problema de saúde pública. Essa problemática atual demonstra a grande importância do monitoramento epidemiológico da disseminação de isolados multirresistentes, assim como a caracterização dos mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos. Técnicas de tipagem molecular como *Multilocus sequence typing* (MLST) permitem uma avaliação da ancestralidade, assim como uma contextualização epidemiológica em âmbito mundial dos isolados analisados.

Diante da importância de *A. baumannii* no ambiente hospitalar, o presente estudo teve como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos, assim como determinar a ancestralidade e a dinâmica populacional de clones tanto endêmicos como epidêmicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos em dois períodos distintos: durante o primeiro surto de CRAb da cidade de Porto Alegre, e cinco anos após, quando níveis endêmicos foram atingidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a diversidade genética e identificar os mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da cidade de Porto Alegre.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar as carbapenemases envolvidas na resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da cidade de Porto Alegre.
2. Determinar a prevalência de integrons de classe 1 e 2 nos isolados avaliados.
3. Avaliar a diversidade genética dos isolados produtores de oxacilinases, através de tipagem molecular (REP-PCR e MLST).
4. Realizar uma análise longitudinal da composição clonal de *A. baumannii* comparando isolados coletados entre 2007-2008 e 2013-2014.
5. Descrever os clones epidêmicos circulantes contendo oxacilinases de importância clínica.
6. Descrever a relação clonal global das cepas circulantes na cidade de Porto Alegre.



### 3. REVISÃO DO TEMA

#### 3.1 Gênero *Acinetobacter* sp.

O gênero *Acinetobacter* sp. pertence à família *Moraxellaceae* e compreende cocobacilos gram-negativos não-fermentadores, não formadores de esporos, aeróbicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Esses microrganismos crescem em ágar sangue formando colônias branco-acinzentadas e em ágar MacConkey com colônias levemente rosadas normalmente cremosas (Peleg et al. 2008). De acordo com a “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* - LPSN” (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>) o gênero *Acinetobacter* sp. é constituído por 43 espécies descritas até o momento.

Algumas espécies de *Acinetobacter* spp. apresentam alto grau de similaridade de forma que não podem ser diferenciadas por testes fenotípicos. Dessa maneira, as espécies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e a espécie recém descrita, *A. dijkshoorniae* sp. nov, foram agrupadas em um complexo denominado *A. baumannii-calcoaceticus* (Gerner-Smidt et al. 1991; Cosgaya et al. 2016). Cabe mencionar que embora as espécies desse complexo sejam altamente relacionadas, *A. calcoaceticus* é considerada uma espécie estritamente ambiental enquanto que as outras três espécies estão associadas a infecções no ser humano (Dijkshoorn et al. 2007).

#### 3.2 Epidemiologia do gênero

Diversas espécies do gênero *Acinetobacter* spp. possuem como habitat natural a água e o solo (Dijkshoorn et al. 2007), embora atualmente já exista descrição de *Acinetobacter* spp. em praticamente qualquer material como alimentos, animais e na natureza. Além disso, no ambiente hospitalar, algumas espécies têm sido isoladas em equipamentos de raio-X, bancadas, leitos, ventiladores e em sistemas de circulação de ar (Dijkshoorn et al. 2007).

A ampla distribuição desse microrganismo é atribuída a sua versatilidade nutricional, já que utiliza uma larga variedade de substratos como fontes de carbono, facilitando sua longa permanência em diversos ambientes (Paterson 2006; Peleg et al. 2008). No entanto, estes achados a respeito da distribuição do gênero *Acinetobacter* sp. no ambiente têm contribuído para equívocos com relação a espécie *Acinetobacter baumannii* e espécies relacionadas como *A.pittii* e *A. nosocomialis*, pois as mesmas não são consideradas ubiqüitárias e muito raramente são isoladas de solo, água ou de outras amostras ambientais (Peleg et al., 2008; Towner, 2009; Howard et al., 2012).

Em humanos, *Acinetobacter* sp. pode colonizar a pele, feridas, e os tratos respiratório e gastrintestinal (Munoz-Price & Weinstein 2008; Giamarellou et al. 2008). Um estudo de vigilância epidemiológica demonstrou que 43% dos indivíduos não hospitalizados apresentava colonização por *Acinetobacter* na pele e nas mucosas. As espécies mais prevalentes no estudo foram *A. lwoffii* (58%), *A. johnsonii* (20%), *A. junii* (10%), e *Acinetobacter pittii* (6%) (Peleg et al. 2008). Em contraste, *A. baumannii*, considerada a espécie de maior importância clínica, foi raramente isolada na pele (0,5 a 3%) e nas fezes (0,8%) de indivíduos saudáveis (Seifert et al. 1997; Peleg et al. 2008; Dijkshoorn et al. 2007).

### **3.3 Infecções causadas por *Acinetobacter baumannii***

Dentre as espécies do complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, *A. baumannii* é a espécie de maior relevância, sendo responsável por causar infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos, com doenças graves, ou que foram submetidos a procedimentos invasivos (Dijkshoorn et al. 2007). As principais infecções associadas a este patógeno são as pneumonias associadas a ventilação mecânica, infecções do trato urinário, meningites secundárias, endocardites, infecções na pele ou tecidos moles e bacteremias (Peleg et al. 2008).

Os fatores de risco para colonização e infecção por *A. baumannii* incluem: longos períodos de internação, cirurgia recente, internação em UTI, uso de



catéteres invasivos, traqueostomia, ventilação mecânica, dieta parenteral, prematuridade em recém-nascidos e terapia antimicrobiana prévia com fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro ou carbapenêmicos (Dijkshoorn et al. 2007; Munoz-Price and Weinstein 2008).

Embora o gênero *Acinetobacter* esteja diretamente relacionado a infecções hospitalares, já existem diversos relatos de infecções adquiridas na comunidade relacionadas a este microrganismo (Giamarellou et al. 2008; Dijkshoorn et al. 2007). Pneumonias adquiridas na comunidade causadas por *Acinetobacter* estão associadas a condições como alcoolismo, tabagismo, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes mellitus (Giamarellou et al. 2008).

### **3.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* e algumas espécies relacionadas possuem uma grande capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos. Atualmente um aumento da resistência a antibióticos de amplo espectro, como  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos já é observado em isolados do mundo todo (Bonnin et al. 2013). Outro fato que deve ser levado em consideração é a resistência intrínseca de *A. baumannii* a diversos antimicrobianos (amoxicilina, cefalosporinas de primeira e segunda geração, ertapenem, trimetoprim e cloranfenicol), característica que contribui para o surgimento de isolados multirresistentes (Bonnin et al. 2013; Dijkshoorn et al. 2007).

Mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser intrínsecos ou adquiridos, sendo ambos observados em *A. baumannii*. Mecanismos intrínsecos incluem, por exemplo, sistemas de efluxo,  $\beta$ -lactamases, e outras enzimas capazes de inativar antimicrobianos como aminoglicosídeos e quinolonas (Levy & Marshall 2004).

Os mecanismos adquiridos envolvem mutações de genes alvo dos antimicrobianos e transferência de determinantes de resistência encontrados em

plasmídios, transposons, bacteriófagos ou outros elementos genéticos móveis (Levy & Marshall 2004). A aquisição desses elementos móveis também tem sido relacionada com o desenvolvimento de multirresistência em *A. baumannii*. Isso se deve à propriedade desses elementos de captar e disseminar genes de resistência como oxacilinas, metalo- $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, entre outros (Vila et al. 2007).

### 3.4.1 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Diversos mecanismos estão envolvidos na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *A. baumannii*. Essa resistência ocorre principalmente devido a mecanismos enzimáticos, como a produção de  $\beta$ -lactamases, no entanto, existem outros mecanismos envolvidos como a hiperexpressão de bombas de efluxo, perda de porinas e modificação de sítio alvo (Peleg et al. 2008).

*A. baumannii* possui duas  $\beta$ -lactamases intrínsecas em seu genoma, uma AmpC, também conhecida como *Acinetobacter-derived cephalosporinase* (ADC) e a CHDL (*Carbapenem Hydrolyzing Class D  $\beta$ -lactamase*) *blaOXA-51*. Essa característica pode contribuir para tornar esse microrganismo resistente a antimicrobianos como cefalosporinas e carbapenêmios (Kempf and Rolain 2012).

Diferente do que ocorre em outras bactérias gram-negativas, a expressão de AmpC não é induzível em *A. baumannii*, além disso, a oxacilinase OXA-51 individualmente, não possui atividade hidrolítica contra carbapenêmicos (Heritier et al. 2005). Entretanto, foi demonstrado que a presença do elemento de inserção *ISAbal upstream* aos genes *blaADC* e *blaOXA-51* causa uma hiperexpressão destes genes, contribuindo para o desenvolvimento de resistência as cefalosporinas de espectro estendido, no caso de *blaADC*, e às penicilinas e carbapenêmicos no caso de *blaOXA-51* (Villalón et al. 2013; Turton et al. 2006a; Gordon & Wareham 2010).

### 3.4.1.1 Resistência aos carbapenêmicos

O potencial de *A. baumannii* em desenvolver resistência a quase todos os grupos de antimicrobianos é inquestionável. Entretanto existe uma preocupação em particular que é o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos os quais são os principais agentes utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* MDR (*Acinetobacter baumannii* multirresistente) (Dijkshoorn et al. 2007; Poirel & Nordmann 2006a).

O uso crescente de carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem) no ambiente hospitalar é decorrente da maior prevalência de bacilos gram-negativos resistentes as cefalosporinas de espectro estendido. O aumento do uso dos carbapenêmicos vem exercendo uma pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, o que pode estar ocasionando um aumento nos níveis de resistência de *A. baumannii* a esses antimicrobianos (Poirel & Nordmann 2006a; Howard et al. 2012).

A diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos é conferida principalmente pela produção de *carbapenem-hydrolyzing class D enzymes* (CHDLs) e, menos frequentemente, por metalo- $\beta$ -lactamases (Peleg et al. 2008; Poirel & Nordmann 2006a). No entanto, o aumento da resistência aos carbapenêmicos também pode estar relacionado a outros mecanismos como a redução da permeabilidade da membrana externa causada pela perda ou expressão reduzida de porinas, hiperexpressão de bombas de efluxo e, menos frequentemente, alteração nas PBPs (proteínas ligantes de penicilinas) (Dijkshoorn et al. 2007).

### 3.4.1.2 $\beta$ -lactamases

A resistência mediada por  $\beta$ -lactamases é particularmente mais eficiente em bactérias gram-negativas do que em bactérias gram-positivas. Isso se deve ao fato de que nas bactérias gram-positivas, as  $\beta$ -lactamases são secretadas no meio extracelular e, portanto são menos eficientes que as enzimas produzidas pelas

bactérias gram-negativas, que se encontram estrategicamente no espaço periplásmico, onde podem alcançar altas concentrações agindo de modo mais eficaz sobre os  $\beta$ -lactâmicos, antes destes atingirem o seu sítio alvo, as PBPs (Livermore & Woodford 2006; Zavascki et al. 2010).

As  $\beta$ -lactamases são o grupo mais diverso de enzimas associadas à resistência em *A. baumannii* (Dijkshoorn et al. 2007). A classificação dessas enzimas está baseada na sua sequência de aminoácidos (classificação de Ambler) ou de acordo com sua função (classificação de Bush) (Bush and Jacoby 2010; Ambler 1980). Segundo a classificação de Ambler, as  $\beta$ -lactamases estão divididas em quatro classes (A, B, C e D), e ainda podem ser separadas em serino- $\beta$ -lactamases (classes A, C e D) e metalo- $\beta$ -lactamases (classe B) (Ambler 1980).

Desde a década de 1980,  $\beta$ -lactamases da classe A emergiram e se disseminaram rapidamente entre isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*. No entanto, somente após 1990 que casos de *A. baumannii* produtores de  $\beta$ -lactamases da classe A foram reportados. As principais enzimas da classe A já relatadas em *A. baumannii* são TEM -1 e -2, PER -1 e -2, VEB -1, -1a e -3, TEM -92 e -116, SHV -5 e -12, GES -11, CTX-M-2 e KPC (Potron et al. 2015).

As enzimas GES possuem uma importante peculiaridade, na qual uma única substituição de aminoácido no sítio ativo da enzima pode ampliar sua capacidade hidrolítica também para os carbapenêmicos (Zavascki et al. 2010). Esse é o caso das variantes descritas até o momento, GES-11 e GES-14 em *A. baumannii*. (Moubareck et al. 2009; Bonnin et al. 2011).

No ano de 2010, foi descrito pela primeira vez isolados de *A. baumannii* produtores de KPC. Essa descrição foi feita na cidade de Porto Rico, e os autores relataram a detecção de uma nova variante de KPC (KPC-10) nos isolados investigados (Robledo et al. 2010). Não foram mais descritos casos de *A. baumannii* produtor de KPC até o momento.

As  $\beta$ -lactamases da classe D (CHDLs) e B (metalo- $\beta$ -lactamases) de Ambler são as principais enzimas envolvidas na resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos (Poirel & Nordmann 2006a). Cepas produtoras dessas

carbapenemases são associadas a surtos de infecção hospitalar, como também, a um aumento da mortalidade de pacientes infectados (Brown & Amyes 2006; Poirel & Nordmann 2006a).

#### 3.4.1.2.1 Metallo- $\beta$ -lactamases

As metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L) são enzimas pertencentes à classe B de Ambler e ao grupo 3 da classificação de Bush e Jacoby (Bush & Jacoby, 2010). Embora as M $\beta$ L sejam menos frequentes em *A. baumannii* do que as oxacilinasas, essas enzimas possuem uma capacidade hidrolítica contra carbapenêmicos de 100 a 1000 vezes maior que as oxacilinasas, além de serem resistentes a inibidores de  $\beta$ -lactamases como sulbactam e clavulanato (Peleg et al. 2008). As M $\beta$ L hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos comercialmente disponíveis, entretanto não possuem atividade contra o aztreonam. O zinco é o principal cofator dessa enzima e devido a essa característica, as M $\beta$ L perdem sua atividade na presença do EDTA e outros cátions bivalentes quelantes de zinco (Queenan & Bush 2007; Walsh et al. 2005).

A partir da década de 90, novos genes que codificam M $\beta$ L foram descritos em patógenos clinicamente importantes como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e membros da família *Enterobacteriaceae* (Walsh et al. 2005). Esses novos genes estão inseridos em elementos genéticos móveis como transposons e integrons. Tais elementos são capazes de promover a disseminação desses genes, conhecidos portanto como M $\beta$ L móveis ou adquiridas. Os genes que codificam importantes M $\beta$ Ls como IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase) e GIM (*German imipenemase*) estão inseridos em cassetes gênicos localizados em integrons de classe 1. Além disso, os genes codificadores de IMP também podem ser encontrados em integrons de classe 3 (Walsh et al. 2005).

O primeiro caso de M $\beta$ L em *A. baumannii* foi descrito no ano 2000 na Itália, em um isolado produtor de IMP-2 (Riccio et al. 2000). A variante IMP-1 foi identificada, posteriormente, no Japão, Itália e Coréia do Sul (Nordmann and Poirel 2002). No Brasil, o primeiro relato de *A. baumannii* produtor de IMP-1 foi

no ano de 2003 (Gales et al. 2003). Entretanto, posteriormente Tognim e colaboradores demonstraram que no ano de 1998 já haviam isolados de *A. baumannii* produtores de IMP-1 no estado de São Paulo (Tognim et al. 2006).

Embora as M $\beta$ Ls não sejam as carbapenemases predominantes em *A. baumannii*, várias delas têm sido descritas: IMP-1, -2, -4, -5, -8 e -10, VIM-1, -2, -3, -4 e -11, SIM-1 e NDM-1 (Cornaglia et al. 2011). A enzima NDM-1 é uma das mais recentes M $\beta$ Ls adquiridas e sua rápida disseminação tem causado grande preocupação. O primeiro caso de *Acinetobacter baumannii* produtor de NDM ocorreu em 2010 na Índia (Karthikeyan et al. 2010). Posteriormente diversos casos já foram reportados no mundo todo, inclusive em isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii* (Zhang et al. 2014; Pagano et al. 2015; Bonnin et al. 2012a). Até o momento existem dois relatos de *Acinetobacter* sp. produtores de NDM-1 no Brasil (Pagano et al. 2015; Pillionetto et al. 2014).

#### 3.4.1.2.2 Oxacilinases

As oxacilinases (OXA) são enzimas pertencentes a classe D de Ambler e inseridas no grupo 2d, 2de e 2df na classificação de Bush (Bush and Jacoby 2010). Essas enzimas possuem uma serina em seu sítio ativo, localizada na posição 70 do sistema de numeração das enzimas de classe D. As oxacilinases usualmente não são inibidas por tazobactam, ácido clavulânico e sulbactam, no entanto sua atividade pode ser inibida por NaCl. NaCl na concentração de 100mM, é capaz de inibir completamente a atividade da maioria das enzimas da classe D. Essa propriedade não é compartilhada com  $\beta$ -lactamases de outras classes, podendo, portanto, ser uma característica útil para identificação *in vitro* desta classe de enzimas (Poirel et al. 2010).

As OXAs possuem a capacidade de hidrolisar oxacilina, amoxicilina, metilcilina, cefaloridina e cefalotina. A designação OXA das  $\beta$ -lactamases de classe D está associada com a capacidade de hidrolisar a oxacilina ou a cloxacilina como substratos preferenciais. Entretanto, com o surgimento de variantes

apresentando capacidade de hidrólise reduzida à estes substratos, esta definição parece não ter mais valor (Poirel et al. 2010).

As  $\beta$ -lactamases pertencentes ao grupo 2df possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, sendo então chamadas de CHDLs (*Carbapenem-hydrolyzing class D enzymes*). As oxacilinas não possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, com exceção da recém descrita OXA-146 (variante da OXA-23), que além de possuir atividade contra carbapenêmicos, também é capaz de hidrolizar ceftazidima. Esta foi a primeira descrição de uma oxacilinase com atividade de ESBL (Poirel et al. 2007; Kaitany et al. 2013).

As CHDLs possuem uma baixa capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos a qual é 100 a 1000 vezes menor quando comparada às M $\beta$ LS (Poirel & Nordmann 2006a). Deste modo, outros mecanismos de resistência (efluxo ou diminuição da permeabilidade) podem ser necessários para que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) do imipenem e meropenem elevem-se acima dos pontos de corte de resistência estabelecidos. Além disso, elementos de inserção, como o IS*Aba1*, podem promover hiperexpressão dos genes que codificam as CHDLs e, conseqüentemente, aumentar a capacidade hidrolítica dessas enzimas (Queenan & Bush 2007; Walsh 2008; Turton et al. 2006a).

As CHDLs estão divididas em seis subgrupos filogenéticos de acordo com sua sequência de aminoácidos: *blaOXA-23-like*, *blaOXA-51-like*, *blaOXA-24/40-like*, *blaOXA-58-like*, *blaOXA-143*, e mais recentemente *blaOXA-235* (Walther-Rasmussen and Hoiby 2006; Higgins et al. 2013; Kim et al. 2010) (Tabela 1). No Brasil, já foram relatados isolados de *A. baumannii* contendo os genes *blaOXA-23-like*, *blaOXA-51-like*, *blaOXA-58-like*, *blaOXA-24/40-like* e *blaOXA-143* (Vasconcelos et al. 2015).

O primeiro isolado de *A. baumannii* com serino- $\beta$ -lactamase capaz de hidrolisar imipenem foi relatado em 1993 na Escócia e primeiramente denominado de ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*) (Paton et al. 1993). O gene *blaARI-1* é composto por 882 pares de bases e codifica uma proteína de 273 aminoácidos

que apresenta uma sequência homóloga à das enzimas da classe D (grupo 2d). Assim, ARI-1 foi considerada uma  $\beta$ -lactamase de classe D e recebeu a denominação alternativa de OXA-23. Desde sua descoberta, já foram descritas 27 variantes de *bla*OXA-23 (Nigro and Hall 2016).

Com o objetivo de avaliar a origem do gene *bla*OXA-23-like, Poirel e colaboradores investigaram a presença deste gene em 14 diferentes espécies do gênero *Acinetobacter* spp.. Os autores observaram a presença do gene *bla*OXA-23-like apenas na espécie *A. radioresistens* sendo que ensaios de hibridização demonstraram que o gene está localizado no cromossomo desta espécie. A partir destes resultados foi possível apontar a espécie *A. radioresistens* como sendo o reservatório do gene *bla*OXA-23-like, o qual pode ter sido posteriormente transferido para *A. baumannii* através de elementos genéticos móveis (Poirel et al. 2008).

*A. radioresistens* é uma bactéria comensal, identificada na pele tanto de pacientes saudáveis quanto hospitalizados. Devido a essa característica, pode-se sugerir que a transmissão do gene *bla*OXA-23 de *A. radioresistens* para *A. baumannii* tenha ocorrido originalmente no ambiente hospitalar. Esta hipótese destaca o possível papel desse local como reservatório de genes de resistência, além de ambiente propício para a transmissão desses genes para outras bactérias (Poirel et al. 2008).

A presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> em isolados de *A. baumannii* já foi observada tanto em DNA de origem plasmidial quanto cromossomal associado a diversas estruturas gênicas como Tn2006, Tn2007, IS*Aba1*, e Tn2008. No transposon Tn2006, *bla*<sub>OXA-23</sub> está flanqueada por duas cópias da sequência de inserção IS*Aba1*, localizadas em direções opostas. Tn2008 é muito similar ao Tn2006, no entanto contém apenas uma cópia da sequência IS*Aba1*, que no Tn2007 é substituída pela sequência de inserção IS*Aba4* adjacente ao gene da *bla*<sub>OXA-23</sub> (Mugnier et al. 2010; Nigro and Hall 2016).

O gene *bla*OXA-23-like estaria unicamente relacionado ao gênero *Acinetobacter* sp.. Entretanto, em 2002 foi reportado o primeiro caso de um



membro da família *Enterobacteriaceae* contendo o gene *blaOXA-23-like*. Neste estudo foram descritos 10 isolados de *Proteus mirabilis* coletados ao longo de quatro anos apresentando *blaOXA-23-like* no cromossomo bacteriano (Bonnet et al. 2002). Em 2014, La e colaboradores descreveram um isolado de *Escherichia coli* com o gene *blaOXA-23* inserido em um plasmídeo não conjugativo de 50 kb. Além disso, foi identificado neste isolado, o elemento de inserção *ISAbal upstream* ao gene *blaOXA-23* apresentando atividade promotora funcional. A análise do contexto genético de *blaOXA-23* demonstrou que esse gene provavelmente foi carregado por um transposon similar aos encontrados em *A. baumannii* (La et al. 2014). Achados como estes, ressaltam a importância de estruturas móveis, como os transposons, na disseminação destas carbapenemases intra e inter-gêneros bacterianos.

Desde sua descoberta, *blaOXA-23-like* é apontado como fonte de surtos de infecção nosocomial em diversos países como Brasil, Colômbia, Inglaterra, Coreia, Taiti, China, Iraque, Afeganistão, Bulgária e Polinésia Francesa (Poirel et al. 2010). No Brasil, o primeiro relato de OXA-23 foi no ano de 2003, relacionado a um surto de *A. baumannii* multirresistente em dois hospitais do Paraná (Dalla-Costa et al. 2003). Após este relato, somente em 2009 foi descrito a disseminação de dois clones de *A. baumannii* multirresistentes produtores da enzima OXA-23 em diversos hospitais da cidade do Rio de Janeiro (Carvalho et al. 2009). Neste mesmo ano, nosso grupo de pesquisa descreveu a disseminação clonal de *A. baumannii* produtor de OXA-23 entre profissionais da saúde, equipamentos médicos e pacientes na cidade de Porto Alegre (Martins et al. 2009). Até o presente momento, OXA-23 é a carbapenemase mais prevalente em isolados de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos no país, sendo observados índices de quase 100% de positividade para o gene em algumas regiões (Martins et al. 2011; Vasconcelos et al. 2015).

Outro grupo de genes codificadores de CHDLs identificado em *A. baumannii* foi *blaOXA-24/40*. A primeira enzima desse grupo, OXA-24, que posteriormente foi renomeada para OXA-40 devido a um erro na sequência

original, foi identificada em 1997 em isolados *A. baumannii* de um surto na Espanha (Bou et al. 2000). Até o momento, seis variantes dessa enzima já foram descritas - OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160 e OXA-207. Apesar de ser inicialmente encontrada apenas em *A. baumannii*, atualmente já existem relatos de *bla*<sub>OXA-24/40</sub> em isolados de outras espécies de *Acinetobacter*, e também em *Pseudomonas aeruginosa* (Sevillano et al. 2009; Evans and Amyes 2014). A variante OXA-24/40 é endêmica em Portugal e na Espanha e tem sido descrita nos Estados Unidos, enquanto a variante OXA-72 tem sido descrita em diferentes países do mundo (Poirel et al. 2010).

Em 2011 foi relatado o primeiro isolado de *A. baumannii* produtor da variante OXA-72 no Brasil (Antonio et al. 2011). Já existem casos de OXA-72 reportados em Recife, São Paulo (Werneck et al. 2011; de Sa Cavalcanti et al. 2013).

O grupo de CHDLs com o maior número de variantes descrito até o momento é o da  $\beta$ -lactamase *bla*OXA-51-like. O gene *bla*OXA-51-like é intrínseco à espécie *A. baumannii*, podendo portanto, ser utilizado como marcador para identificação da espécie (Turton et al. 2006b). No entanto, alguns estudos já descreveram a presença desse gene em isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii*, (Lee et al. 2012b; Lee et al. 2009b). O gene foi relatado pela primeira vez em 2005 em isolados de *A. baumannii*, não relacionados geneticamente, na Argentina e, desde então, diversas variantes do mesmo já foram descritas (OXA-64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -75, -76, -77, -83, -84, -86, -87, -88, -89, -91, -92, -94 e -95) (Brown et al. 2005).

Apenas a produção de OXA-51 não é capaz de conferir resistência aos carbapenêmicos. Entretanto, estudos relacionam a presença do elemento de inserção *ISAbal upstream* ao gene *bla*OXA-51-like, com fenótipos de resistência aos carbapenêmicos. Esses dados demonstram, que apesar de intrínseco, a presença desse gene associado à um elemento de inserção pode acarretar na diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos (Turton et al. 2006a; Poirel & Nordmann 2006a). Apesar da relação entre a resistência aos carbapenêmicos e a

associação *ISAbal/blaOXA-51* estar bem descrita, alguns estudos já evidenciaram isolados de *A. baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos apresentando esta associação (Pagano et al. 2012; Bratu et al. 2008).

O grupo filogenético do gene *blaOXA-58-like* em *Acinetobacter* spp. está disseminado mundialmente, principalmente no continente europeu. Além disso, este grupo está fortemente associado à resistência aos carbapenêmicos, assim como à outros  $\beta$ -lactâmicos, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Em 2003, na França foi isolado o primeiro *A. baumannii* contendo *blaOXA-58-like* (Poirel et al. 2005). Em 2010, Figueiredo e colaboradores relataram o primeiro isolado de *A. baumannii* contendo *blaOXA-58-like* na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (Figueiredo et al. 2011). Trabalhos já evidenciaram a ampla disseminação deste gene no mundo todo, principalmente no continente europeu. Entretanto, no Brasil, os casos se restringiram ao Rio de Janeiro e no ano seguinte à cidade de Porto Alegre (de Souza Gusatti et al. 2012).

Em 2009, uma nova oxacilinase, OXA-143, foi descrita em um isolado de *A. baumannii* do Brasil (Higgins et al. 2009). Experimentos de clonagem evidenciaram que esta nova CHDL apresenta 88% de identidade com OXA-40, 63% de identidade com OXA-23 e 52% de identidade com OXA-58. OXA-143 possui a capacidade de hidrolisar penicilinas, oxacilina, meropenem e imipenem. A análise do ambiente genético de *blaOXA-143* demonstrou a ausência de integrons ou sequências de inserção associadas ao gene, entretanto foi evidenciada a presença de genes codificadores de replicase flanqueando o *blaOXA-143*, sugerindo que o gene foi adquirido através de recombinação homóloga (Higgins et al. 2009).

O gene *blaOXA-143*, depois de *blaOXA-23*, é considerado o segundo mais prevalente no Brasil, entretanto, o que chama atenção é o fato do mesmo ainda estar restrito a região sudeste do país, principalmente ao estado de São Paulo (Antonio et al. 2011; Mostachio et al. 2012; Werneck et al. 2011). Esse gene parece estar restrito ao território brasileiro até o momento, ainda não há relatos deste gene em outras regiões do mundo.

Higgins e colaboradores identificaram em 2013 a nova CHDL, OXA-235. Esta nova beta-lactamase apresentou de 54% a 57% de identidade com OXA-23, OXA-24, OXA-58, e OXA-143, além de 56% de identidade com OXA-51. Desta forma, essa enzima foi classificada como uma nova classe de OXA. A expressão deste gene demonstrou acarretar a diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos, enquanto as concentrações inibitórias mínimas (MICs) para cefalosporinas permaneceram inalterados (Higgins et al 2013).

De acordo com Queenan & Bush, a capacidade de hidrólise dos carbapenêmicos pelas CHDLs é baixa devido ao baixo  $k_{cat}$  dessas enzimas (Queenan and Bush 2007). Deste modo, particularmente no gênero *Acinetobacter* sp., a associação das CHDLs a elementos genéticos móveis, como as sequências de inserção (IS), pode ser necessária para aumentar os níveis de expressão do gene, de forma que as MICs dos carbapenêmicos elevem-se acima dos pontos de corte de resistência estabelecidos (Turton et al. 2006a). Além disso, diversos trabalhos já demonstram o papel de transposons, na disseminação de carbapenemases entre isolados de *A. baumannii*, e até mesmo entre outras espécies do gênero (Poirel et al. 2012; Mugnier et al. 2010).

### **3.5 Elementos Genéticos Móveis**

#### **3.5.1 Ilhas de resistência**

Ilhas genômicas contendo marcadores de resistência são denominadas ilhas de resistência. Estas ilhas foram descritas em diversos microrganismos como *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, e mais recentemente em *A. baumannii* (Fournier et al. 2006; Schmidt and Hensel 2004). Cepas de *A. baumannii* abrigam grandes *clusters* (ilhas de resistência) de genes transferidos horizontalmente, capazes de conferir resistência a múltiplos antibióticos e metais pesados. Esses *clusters* estão inseridos em sítios específicos do genoma bacteriano, em particular na região do gene ATPase (Post et al. 2010).

A Ilha de Resistência de *A. baumannii* (AbaR) é definida como a região que foi transposta em uma posição específica do cromossomo bacteriano, criando um sítio de duplicação de 5 bp (ACCGC) (Bonnin et al. 2012b). A estrutura de AbaR é constituída por cinco *open reading frames* (ORFs) -*orf1*, *tniA*, *tniB*, *orf2*, *orf3*- que constituem o módulo de transposição, além de dois outros genes que codificam uma proteína de estresse universal (*uspA*) e uma sulfato permease (*sul*) (Fournier et al. 2006; Post et al. 2010; Seputiene et al. 2012).

Diversas ilhas genômicas de resistência já foram completamente caracterizadas contendo uma variedade de genes, incluindo *blaOXA-23*, capaz de conferir resistência aos carbapenêmicos (Zhu et al. 2013). A maioria delas foi evidenciada em cepas de *A. baumannii* pertencentes ao *International clone I* (IC I) (AbaR1, AbaR3-AbaR21, e AbaR3-like) e ao *International clone II* (IC II), (AbaR2, AbaR4-like, AbaR22, e AbaR22-like) conhecidos por sua capacidade de disseminação mundial (Post et al. 2010; Krizova et al. 2011; Karah et al. 2012).

### 3.5.2 Transposons

Transposons possuem a habilidade de se deslocar dentro do genoma bacteriano, podendo se translocar de um sítio a outro dentro de uma mesma molécula de DNA, assim como de um plasmídeo a outro, ou de um plasmídeo para o cromossomo. A transposição é considerada uma das principais causas de rearranjos no DNA bacteriano, que conseqüentemente poderá causar mudanças na expressão gênica (Lewin 2004; Bennett 2004).

Atualmente, diversas estruturas têm sido relacionadas ao gene *blaOXA-23*, como Tn2006, Tn2008, e Tn2009. Nestas quatro estruturas, o elemento IS*Aba1* se encontra diretamente *upstream* ao códon de iniciação de *blaOXA-23*. Por serem flanqueados por duas cópias da sequência de inserção IS*Aba1*, Tn2006 e Tn2009 são classificados como transposons compostos (Nigro and Hall 2016). No Tn2009, estas sequências se encontram em sentidos opostos, enquanto que, no Tn2006 as duas cópias de IS*Aba1* encontram-se no mesmo sentido de transcrição (Figura 1).

Trabalhos já demonstraram a capacidade de mobilização do transposon Tn2006 e sua ampla distribuição mundial em isolados de *A. baumannii* (Nigro & Hall 2016; Mugnier et al. 2009; Lee et al. 2012a). Em contrapartida, relatos da presença de Tn2009 ainda se restringem a províncias da China (Zhou et al. 2011).

O Tn2008 apresenta uma estrutura mais simplificada, com apenas uma cópia de IS*Aba1* upstream ao gene *blaOXA-23*. Quando esta cópia é substituída pela sequência de inserção IS*Aba4*, o transposon é então denominado Tn2007. Ainda não existem evidências sobre a capacidade de mobilização destes elementos (Nigro & Hall 2015).

### 3.5.3 Sequências de inserção

As sequências de inserção (IS) bacterianas são o tipo mais simplificado de elemento transponível, raramente ultrapassando o tamanho de 2 kb. As IS são unidades autônomas responsáveis por codificar proteínas que atuam apenas na transposição desse elemento. Além disso, estes elementos podem causar mutações e rearranjos no genoma bacteriano, aumentando a disseminação de determinantes de resistência e virulência intra- e inter-espécies (Mahillon & Chandler 1998; Bennett 2004).

Além de possuírem papel de transposição, algumas ISs atuam na ativação ou no aumento da expressão de genes localizados adjacentes a elas (Turton et al. 2006a; Mahillon & Chandler 1998). Essa ativação de genes vizinhos já foi descrita em diversas famílias de sequências de inserção como IS1, IS2, IS3, IS4, IS5 e IS10. Esse fenômeno pode ser devido à presença de regiões promotoras no elemento de inserção ou pela formação de novos promotores após a inserção (Berg & Howe 1989).

Diversos trabalhos demonstram que alguns elementos de inserção, especialmente IS*Aba1*, possuem um importante papel na resistência em *A. baumannii* (Turton et al. 2006a; Mahillon & Chandler 1998). O elemento IS*Aba1* pertence à família IS4, possui IRs de 11pb, e está flanqueado por DRs de 9pb (Berg & Howe 1989). Esses elementos são considerados exclusivos de *A.*

*baumannii*, entretanto, Segal e colaboradores identificaram o elemento *ISAbal* em isolados de *Acinetobacter lwoffii* sensíveis a todos antimicrobianos testados, exceto ao cotrimoxazol. Nesse mesmo estudo, foi evidenciado que podem existir diversas cópias de *ISAbal* por genoma bacteriano (Segal et al. 2005). Além de estar relacionado ao aumento da resistência aos carbapenêmicos, o elemento *ISAbal*, quando *upstream* ao gene *blaADC*, aumenta sua expressão em níveis capazes de causar resistência a ceftazidima em *A. baumannii* (Heritier et al. 2006).

*ISAbal* já foi localizado na região *upstream* de genes como *blaOXA23-like*, *blaOXA-51-like*, *blaOXA-58-like* e *blaAmpC* (Corvec et al. 2007; Corvec et al. 2003). Esse elemento de inserção fornece uma sequência promotora capaz de propiciar a hiperexpressão desses genes de resistência. Em estudo realizado por Turton e colaboradores, os autores sugerem que os genes *blaOXA-23* e *blaOXA-51* conferem resistência aos carbapenêmicos quando associados ao elemento *ISAbal* (Turton et al. 2006a). Os elementos *ISAbal2*, *ISAbal3* e *ISAbal4* também já foram identificados *upstream* ao gene *bla<sub>OXA-58</sub>* em isolados de *A. baumannii*, e assim como *ISAbal*, estes elementos demonstraram fornecer uma sequência promotora ao gene, aumentando sua expressão, e com isso, conferindo resistência aos carbapenêmicos (Poirel & Nordmann 2006b).

### 3.5.4 Integrons

O termo integron foi utilizado inicialmente em 1989 por Stokes & Hall, para descrever o grupo de elementos móveis que continham um ou mais genes de resistência a antimicrobianos localizados em um sítio específico, além de conter os determinantes da recombinação sítio-específica responsáveis pela inserção de genes de resistência (Hall & Collis 1995). Este elemento é caracterizado como uma unidade genética que inclui os componentes necessários para um sistema de recombinação sítio-específica capaz de capturar e mobilizar genes inseridos em cassetes (Mazel 2006; Gillings 2014).

Até o momento, já foram descritas cinco diferentes classes de integrons baseadas nas sequências de suas respectivas integrases (Gillings 2014). As classes

1, 2 e 3 já estão claramente descritas na literatura e mostram-se associadas a fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos (Gillings 2014). As outras duas classes de integrons estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência a trimetoprim em espécies de *Vibrio* spp. (Cambray et al. 2010).

Integrons de classe 1 são os mais disseminados e com a maior importância clínica dentre todas as classes, sendo detectados em 22% a 59% das bactérias gram-negativas, embora também possam ser evidenciados em bactérias gram-positivas (Cambray et al. 2010). Além disso, a maioria dos cassetes gênicos responsáveis por causar resistência aos antibióticos estão localizados nessa classe de integrons (Mazel 2006). Diversos genes já foram descritos nestes cassetes gênicos, como por exemplo, genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetopim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, lincomicina além de anti-sépticos da família das amônias quaternárias (Mazel 2006).

Integrons de classe 1 são os mais prevalentes em *Acinetobacter* sp, com diversos relatos na Europa, Ásia e Estados Unidos (Turton et al. 2005; Lee et al. 2009a). Em contrapartida, estudos realizados em países da América Latina, como Chile, Argentina e Brasil demonstram uma maior distribuição de integrons de classe 2 entre os isolados de *A. baumannii* (Gonzalez et al. 1998; Oh et al. 2002; Fonseca et al. 2011; Pagano et al. 2012).

Integrons de classe 1 e 2 estão relacionados a surtos de infecção hospitalar em isolados de *A. baumannii*. Em estudo realizado por Turton e colaboradores observou-se que todos os isolados de *A. baumannii* associados a surtos continham integrons de classe 1, entretanto nenhum isolado esporádico apresentou essa classe de integron. Além disso, nesse estudo nenhum isolado apresentou integrons de classe 2 (Turton et al. 2005). Recentemente, em um trabalho publicado por Martins e colaboradores, isolados de *A. baumannii* contendo integrons de classe 1 e 2 foram relacionados com os clones epidêmicos CC1 e CC79 (Instituto Pasteur), respectivamente (Martins et al. 2015). Esse resultado pode explicar a maior prevalência de integrons de classe 2 na América Latina, onde CC79 apresenta uma



maior prevalência, quando comparada aos isolados de *A. baumannii* da Europa (Camargo et al. 2016).

### 3.6 Tipagem Molecular

Para uma melhor compreensão da epidemiologia, e em particular do modo de disseminação de *A. baumannii* no ambiente hospitalar é necessário identificar as fontes e o modo de transmissão dessa bactéria. Os métodos de tipagem molecular possuem a finalidade de estabelecer o grau de similaridade genética entre diferentes isolados bacterianos, auxiliando na caracterização de surtos, na identificação de transmissão cruzada e de fontes, assim como no monitoramento e controle de surtos de infecções nosocomiais (Singh et al. 2006; Sabat et al. 2013).

Existem diversos métodos de tipagem molecular que podem ser utilizados para a caracterização e investigação de um surto, como técnicas baseadas na utilização de PCR (RAPD, ERIC-PCR, AP-PCR e REP-PCR), ribotipagem, análises no padrão de restrição do DNA como as técnicas de *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *multilocus sequence typing* (MLST), e mais recentemente, sequenciamento do genoma completo (Singh et al. 2006; Peleg et al. 2008; Sabat et al. 2013).

#### 3.6.1 Métodos de tipagem baseados na reação de PCR

Métodos de tipagem baseados em PCR são utilizados para estabelecer a relação genética entre isolados de *Acinetobacter*. Estas técnicas são vantajosas por apresentarem menor custo, maior agilidade nos resultados, serem de fácil execução e não demandarem equipamentos especializados para sua execução (Sabat et al. 2013; Singh et al. 2006).

Diversas espécies bacterianas possuem sequências repetidas de DNA em seu genoma (Versalovic et al. 1991). Devido a essa característica, técnicas baseadas na amplificação do DNA a partir destas sequências repetidas, como *repetitive extragenic palindromic sequence* (REP-PCR) e *enterobacterial repetitive*

*intergenic consensus* (ERIC-PCR), são muito utilizadas para a tipagem molecular de importantes patógenos como *Acinetobacter* spp. (Sabat et al. 2013).

REP-PCR é um método que utiliza *primers* que hibridizam com sequências repetitivas não-codificadoras dispersas pelo genoma. *Amplicons* de diferentes pesos moleculares são gerados de acordo com a posição dos elementos repetitivos ao longo do genoma, e são visualizados por eletroforese em gel de agarose. Os seus padrões de bandas são comparados para determinar a relação genética entre os isolados bacterianos analisados (Carretto et al. 2011). A tipagem por REP-PCR é de rápida execução e apresenta boa capacidade discriminatória para diversas espécies bacterianas (Saeed et al. 2006; Sabat et al. 2013). Diversos estudos já observaram uma boa correlação entre a técnica de REP-PCR e PFGE (Karah et al. 2012). A maior limitação do método é a baixa reprodutibilidade, que pode resultar da variabilidade de reagentes e sistemas de eletroforese (Sabat et al. 2013).

### **3.6.2 Tipagem molecular por macro-restrição seguida de PFGE**

PFGE (“*pulsed field gel electrophoresis*”) é a sigla usada para indicar a técnica de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA por meio da reorientação do DNA em gel, pela ação de campos elétricos alternados. A técnica de tipagem propriamente dita, é uma metodologia que utiliza enzimas de restrição de ação rara na clivagem de DNA (técnica de macrorestrição), o que gera um perfil de restrição que representa a integralidade do DNA bacteriano. Esta metodologia foi desenvolvida por Schwartz & Cantor e originalmente foi usada para separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Schwartz & Cantor 1984). Apesar de já existirem novos métodos para tipagem, inclusive utilizando o sequenciamento do genoma, a técnica de PFGE continua sendo útil na tipagem molecular de *Acinetobacter*, apresentando alto poder discriminatório (Zarrilli et al. 2013).

A análise dos resultados pode ser feita através de interpretação visual do gel utilizando o critério de Tenover (Tenover et al. 1995) por exemplo, ou através de *softwares* que utilizam coeficientes e são capazes de construir um dendrograma

através do método de agrupamento que utiliza a média aritmética não ponderada (UPGMA) (Singh et al. 2006). Através da análise do perfil de macrorestrição do DNA utilizando PFGE, é possível determinar o grau de similaridade entre isolados de *A. baumannii* (Peleg et al. 2008).

A técnica de PFGE é altamente discriminatória e apresenta grande concordância epidemiológica, sendo útil para caracterização de surtos. Entretanto, é considerada uma metodologia cara, que despende de tempo e bastante trabalhosa. Além disso, a técnica apresenta a desvantagem da difícil comparação interlaboratorial dos resultados, deste modo, a tipagem fica restrita geralmente a um número de amostras analisadas em uma mesma instituição para caracterização da epidemiologia local (Sabat et al. 2013; Singh et al. 2006; Peleg et al. 2008).

### **3.6.3 Multilocus sequence typing - MLST**

A técnica de MLST foi proposta inicialmente em 1998 para a espécie *Neisseria meningitidis*, entretanto com o passar do tempo, a técnica passou a ser aplicada para outras espécies patogênicas, e até mesmo para bactérias ambientais (Cooper & Feil 2004). A técnica foi desenvolvida com o propósito de fornecer dados acurados para a investigação epidemiológica de patógenos através da detecção de variações nos genes denominados *housekeeping* (genes constitutivos necessários para as atividades básicas da função celular) (Maiden et al. 1998; Urwin & Maiden 2003).

MLST pode ser considerada uma variação de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) pois também se baseia no estudo de diferentes genes *housekeeping*. A principal diferença entre as duas técnicas é que MLEE avalia a mobilidade eletroforética de isoenzimas codificadas pelos genes analisados, e o MLST analisa diretamente as sequências destes genes, identificando mutações que caracterizam alelos distintos (Cooper & Feil 2004).

Essa metodologia baseia-se na análise da sequência dos fragmentos internos de genes. Os genes *housekeeping* são escolhidos para análise pois são constitutivos e essenciais para garantir a sobrevivência da célula e por isso, muito conservados

dentro de cada espécie. Cada gene *housekeeping* analisado, recebe um número de acordo com sua sequência de nucleotídeos, a combinação numérica dos sete genes analisados forma o chamado perfil alélico ou *sequence type* (ST) (Perez-Losada et al. 2013). Além disso, quando as STs compartilham 5/7 ou 6/7 alelos em comum, podem ser agrupadas e recebem a denominação de complexo clonal (CC). A formação de complexos clonais é uma maneira de facilitar a análise dos dados epidemiológicos gerados.

Alguns bancos de dados possuem uma ampla variedade de diferentes STs, dando a falsa impressão de uma diversidade ilimitada. Contudo, a análise destes dados mostra que, apesar de algumas STs apresentarem uma baixa frequência, outras são mais prevalentes. Estas últimas geralmente são isoladas durante anos, além de apresentarem uma ampla distribuição geográfica (Urwin & Maiden 2003; Karah et al. 2012).

Além disso, quando os dados são analisados por técnicas heurísticas, como o algoritmo BURST (com base em tipos de sequências relacionadas), estas STs ocupam uma posição central, na medida em que têm numerosas STs relacionadas que parecem ser derivadas a partir deles por um número limitado de acontecimentos genéticos. Estes “genótipos centrais” formam a base do complexo clonal a qual dão o nome como, por exemplo, os complexos clonais CC1, CC2, CC79 de *A. baumannii* originados por ST1, ST2 e ST79 respectivamente (Figura 2) (Karah et al. 2012; Urwin & Maiden 2003).

Atualmente, MLST é considerada a técnica que melhor atende para a investigação de estruturas populacionais e da epidemiologia global de isolados bacterianos (Urwin & Maiden 2003). Existem dois esquemas disponíveis para a caracterização de isolados de *Acinetobacter baumannii* e não-*baumannii*, ambos baseados na análise das sequências internas de sete genes *housekeeping* o esquema do Instituto Pasteur (Diancourt et al. 2010) que avalia os genes *gltA*, *recA*, *cpn60*, *fusA*, *pyrG*, *rpoB*, e *rplB* e o da Universidade de Oxford (Bartual et al. 2005) que avalia os genes *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, e *rpoD*. Até o momento, o esquema da Universidade de Oxford apresenta em seu banco de dados 1344 perfis

de MLST, enquanto que o esquema mais recente, do Instituto Pasteur, possui 905 (Figura 3) (<http://pubmlst.org/abaumannii/> acessado em 05 de Agosto de 2016).

Considerando a escala epidemiológica temporal, pode-se dizer que a técnica de MLST oferece uma análise micro e macro epidemiológica dos isolados, pois permite a comparação de resultados entre laboratórios e instituições de saúde, diferente de técnicas como PFGE, AFLP e RFLP que são capazes de fornecer apenas dados micro epidemiológicos devido a inviabilidade de comparações interlaboratoriais, ou interinstitucionais de resultados, tornando os dados gerados restritos apenas a locais específicos (Perez-Losada et al. 2013).

As técnicas de PFGE e MLST são ferramentas complementares para análises populacionais de *A. baumannii*. Isto se deve ao fato de PFGE possuir um maior poder discriminatório para estudos de pequenas populações, enquanto MLST possui uma maior capacidade de agrupar isolados durante análises globais de grande escala e por longos períodos de tempo (Hamouda et al. 2010; Karah et al. 2012).

### **3.7 Epidemiologia global de *Acinetobacter baumannii***

A espécie *A. baumannii* é reconhecida pela sua grande capacidade de adquirir novos determinantes de resistência, sua propensão a se propagar dentro do ambiente hospitalar e entre diferentes instituições, além de sua disseminação global (Dijkshoorn et al. 2007). Diversos surtos hospitalares causados por clones multirresistentes de *A. baumannii* no mundo todo demonstraram estar associados a um número limitado de *clusters* (Durante-Mangoni & Zarrilli 2011).

A tipagem comparativa de isolados de *A. baumannii* causadores de surtos em hospitais da Europa demonstrou a ocorrência de três principais clones, originalmente denominados “*European clones I, II e III*” (Karah et al. 2012; Durante-Mangoni and Zarrilli 2011). Contudo, posteriormente estes clones foram identificados no mundo todo, e com isso foram renomeados para “*International clones I, II e III*”, e de acordo com o perfil de MLST foram denominados

complexos clonais 1, 2 e 3, respectivamente (Instituto Pasteur) (Durante-Mangoni & Zarrilli 2011; Diancourt et al. 2010).

Perfis de multirresistência estão geralmente relacionados aos isolados pertencentes a estes clones internacionais, além disso, a emergência destes clones epidêmicos altamente bem sucedidos, parece estar diretamente associada ao aumento da ocorrência global de infecções causadas por *A. baumannii*. Além destes três principais clones, já foram descritos outros importantes complexos clonais como CC15 e CC79 disseminados em diversos continentes (Durante-Mangoni & Zarrilli 2011).

No Brasil, estudos já demonstraram a disseminação dos complexos clonais CC2 (*International clone II*), CC79 e CC15 associados a disseminação de *A. baumannii* multirresistente produtor de *blaOXA-23* em diversos estados do país (Chagas et al. 2014; Vasconcelos et al. 2015). Além destes, Clímaco e colaboradores relataram o importante papel dos complexos clonais CC104, CC109 e CC113 (Universidade de Oxford) na disseminação de oxacilinases na região Sudeste do país (Clímaco et al. 2013).

#### 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Nesta tese de doutorado serão apresentados cinco artigos científicos, o primeiro destes foi publicado no *International Journal of Antimicrobial Agents*, o segundo publicado na revista Memórias do Instituto Osvaldo Cruz, o terceiro é um artigo de revisão publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology*, e os dois artigos restantes estão em fase de submissão. O primeiro destes trabalhos foi desenvolvido durante meu estágio de doutorado Sanduíche, com bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de junho de 2014 a dezembro de 2014. O estágio foi realizado no “*Medical and Molecular Microbiology Unit*” na “*University of Fribourg*”, localizada no cantão de Fribourg, Suíça, sob supervisão do Professor Dr. Patrice Nordmann e do Dr. Laurent Poirel.





**4.1 MANUSCRITO I - Emergence of NDM-1 producing *Acinetobacter pittii* in Brazil**

Manuscrito publicado no *International Journal of Antimicrobial Agents*





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

## Letter to the Editor

**Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil**

Sir,

The New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM), initially reported in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, is now disseminated worldwide mostly among Enterobacteriaceae [1]. The NDM carbapenemase has also been described in *Acinetobacter baumannii*, but only in sporadic cases in countries such as China, India, Egypt, Germany, Israel and, more recently, Brazil [1,2]. Noteworthy, recent studies reported NDM-producers among non-*baumannii* *Acinetobacter* spp., which may also be human pathogens. Here we report the first case of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil.

A 66-year-old male patient with bladder carcinoma was admitted for radical cystectomy to a 900-bed tertiary care hospital in Porto Alegre, Southern Brazil, on 25 February 2013. Fifteen days later he presented an intestinal subocclusion and fever. Computerised tomography (CT) of the abdomen showed the presence of a collection in pelvis, which was drained surgically. This purulent secretion was cultured and a *K. pneumoniae* was identified (VITEK<sup>®</sup> 2 system; bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). Urine was also cultured and revealed the presence of *Candida* sp. (50 000 CFU/mL) and *Acinetobacter* sp. (>100 000 CFU/mL). The patient was treated with intravenous meropenem 500 mg every 12 h for 7 days, followed by cefepime 1 g every 24 h (doses adjusted to impaired renal function). Three subsequent urine cultures obtained 11, 28 and 44 days after the first culture were negative for *Acinetobacter* sp. The patient was therefore considered colonised by *Acinetobacter* sp. After 90 days the patient improved and was discharged from the hospital.

The *Acinetobacter* sp. isolate MP was identified as *A. pittii* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), *gyrB* multiplex PCR and 16S rRNA gene sequencing. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, ciprofloxacin, fosfomycin, chloramphenicol, tigecycline, colistin and polymyxin B were determined (Etest<sup>®</sup> and microdilution method) and showed that the isolate was resistant to all  $\beta$ -lactams (with the exception of aztreonam), including carbapenems (MICs of imipenem, ertapenem, doripenem and meropenem >32  $\mu$ g/mL). The isolate remained susceptible to amikacin, gentamicin, tigecycline, colistin, polymyxin B, ciprofloxacin and chloramphenicol. Carbapenemase genes were searched by real-time PCR (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub>) and multiplex PCR (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub>). A positive signal was obtained only for the *bla*<sub>NDM</sub> gene, and sequencing identified the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. To identify the location of this gene, electrotransformation assays were attempted using plasmid DNA extracts from *A. pittii* isolate MP using *A. baumannii* CIP7010 and *E. coli* TOP10 as recipients. Transfer of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene by electrotransformation into these two recipient strains remained unsuccessful, suggesting that the gene might be

chromosomally located in *A. pittii* MP, as reported in *A. baumannii* [3].

The genetic environment of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was determined by PCR mapping as described [3] and insertion sequence IS<sub>Aba125</sub> was identified upstream of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. However, attempts to identify another copy of IS<sub>Aba125</sub> downstream of *bla*<sub>NDM-1</sub> remained unsuccessful, suggesting that the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene might be part of a truncated Tn125 transposon, as previously reported in *A. baumannii* [3]. Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to the Institute Pasteur scheme (<http://www.pasteur.fr>) and *A. pittii* isolate MP was identified as ST119. Interestingly, two *bla*<sub>NDM</sub>-positive *A. pittii* isolates were recently identified in Paraguay [4], a neighbouring country of Brazil, but those isolates belonged to ST320 and ST321. The only reports of *A. pittii* ST119 isolates are from Japan, with isolates producing the carbapenemase IMP-19 [1].

Identification of *bla*<sub>NDM</sub>-positive non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. is now increasingly reported worldwide, concomitantly with those of *bla*<sub>NDM</sub>-positive *A. baumannii* isolates. There are few reports of NDM-producing *A. pittii*, being from China, Turkey and recently Paraguay. This is of particular concern considering that *Acinetobacter* sp. may (i) act as reservoirs for *bla*<sub>NDM</sub> genes in non-human settings, as recently shown in several Chinese studies with identification of NDM-1-producers among *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* from environmental samples from livestock farms [1], *Acinetobacter johnsonii* from hospital sewage [1] and *Acinetobacter lwoffii* from chickens [1], but also (ii) act as a source of *bla*<sub>NDM</sub> genes then horizontally transferred to enterobacterial species as evidenced [5].

**Funding:** This work was funded by the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Brasilia, Brazil), by the University of Fribourg (Fribourg, Switzerland) and by grants from the European Community [R-GNOSIS, FP7/HEALTH-F3-2011-282512, and MAGIC-BULLET, FP7/HEALTH-F3-2001-278232].

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

**References**

- [1] Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol* 2014;9:33–41.
- [2] Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:7592–4.
- [3] Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of *bla*<sub>NDM-like</sub> genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1087–9.
- [4] Pasteran F, Mora MM, Albornoz E, Faccione D, Franco R, Ortellado J, et al. Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2575–8.

- [5] Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4224–9.

Mariana Pagano<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Medical and Molecular Microbiology Unit 'Emerging Antibiotic Resistance', Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, 3 rue Albert-Gockel, CH-1700 Fribourg, Switzerland

<sup>b</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

Laurent Poirel\*

Medical and Molecular Microbiology Unit 'Emerging Antibiotic Resistance', Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, 3 rue Albert-Gockel, CH-1700 Fribourg, Switzerland

Andreza Francisco Martins<sup>a,b</sup>

Francieli P. Rozales<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

Alexandre Prehn Zavascki<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto, Porto Alegre, Brazil

Afonso Luis Barth<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

Patrice Nordmann<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Medical and Molecular Microbiology Unit 'Emerging Antibiotic Resistance', Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, 3 rue Albert-Gockel, CH-1700 Fribourg, Switzerland

<sup>b</sup> HFR - Hôpital Cantonal de Fribourg, Fribourg, Switzerland

\* Corresponding author. Tel.: +41 26 300 9582.  
E-mail address: [laurent.poirel@unifr.ch](mailto:laurent.poirel@unifr.ch) (L. Poirel)

23 December 2014

**4.2 MANUSCRITO II - Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730  
carrying the *bla*OXA-72 gene in Brazil**

Manuscrito publicado no Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



## LETTER TO THE EDITOR

## Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the *bla*<sub>OXA-72</sub> gene in Brazil

Mariana Pagano<sup>1,2/+</sup>, Franciéli P Rozales<sup>1,2</sup>,  
Diego Bertolini<sup>2</sup>, Lisiane Rocha<sup>3</sup>, Jorge LM  
Sampaio<sup>3</sup>, Afonso L Barth<sup>1,2</sup>, Andreza F Martins<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil <sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Porto Alegre, RS, Brasil <sup>3</sup>Laboratório Fleury, Porto Alegre, RS, Brasil <sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, Brasil

Over the last decade, *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenems has emerged in many medical centres and has been commonly associated with high morbimortality. In Brazil, this resistance is mainly attributed to the spread of OXA-23-producing clones and, to a lesser extent, to OXA-143-producing clones. Here, we describe, for the first time, two OXA-72-producing *A. baumannii* isolates in southern Brazil to a broad spectrum of antibiotics, except polymyxin B and tigecycline. Molecular typing by multilocus sequence typing (MLST) demonstrated that both OXA-72-producing isolates belong to a new sequence type (ST), ST730, which was recently identified in OXA-23-producing *A. baumannii* isolates in São Paulo, Brazil. We demonstrate that the two *A. baumannii* ST730 isolates carrying *bla*<sub>OXA-72</sub> share a common ancestral origin with the *bla*<sub>OXA-23</sub> producers in Brazil. This observation reinforces the importance of strain-typing methods in order to clarify the dynamics of the emergence of new clones in a geographic region.

Key words: *Acinetobacter baumannii* - MLST - OXA-72

Recently, a new sequence type, ST730, from an OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* has been deposited in the multilocus sequence typing (MLST) database (<http://www.pasteur.fr>) (Vasconcelos et al. 2015). In the present study, we describe two isolates of *A. baumannii* ST730 carrying the *bla*<sub>OXA-72</sub> gene from different patients in a hospital located in southern Brazil.

In March 2013, a carbapenem-resistant *Acinetobacter* sp. was isolated using VITEK®2 system (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France) from the tracheal aspirate (> 10<sup>6</sup> CFU/mL) of a 76-year-old female ICU patient in a 312-bed tertiary care hospital in Porto Alegre, southern Brazil. A few days later, another carbapen-

em-resistance in *Acinetobacter* sp. was reported from a blood culture (positive in 12 h) of an 86-year-old male ICU patient admitted with sepsis in the same hospital. Both the isolates were identified as *A. baumannii* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF; Bruker Daltonik, Bremen, Germany) spectrometry and *gyrB* multiplex polymerase chain reaction (PCR). Disc-diffusion assays demonstrated that the isolates were resistant to meropenem, imipenem, amikacin, ampicillin-sulbactam, ceftepime and ceftazidime. However, the isolates were found to be susceptible to polymyxin (MICs 1 and 2 µg/mL) and tigecycline (MICs 0.5 and 0.75 µg/mL) as per microdilution and Etest® assays, respectively. The results obtained were interpreted according to the CLSI guidelines (CLSI 2014). The carbapenemase genes (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>OXA-143-like</sub>) were investigated by multiplex PCR as previously described (Higgins et al. 2010). The *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> gene was detected in both the isolates. Sequencing of *bla*<sub>OXA-24</sub> gene (ABI 3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) identified the variant *bla*<sub>OXA-72</sub>, which displayed 100% identity to the original *bla*<sub>OXA-72</sub> gene (GenBank accession number AY739646.1). Clonal diversity, investigated by repetitive-sequence-based PCR (REP-PCR), revealed an identical profile of the isolates (Bou et al. 2000). MLST was performed according to the Institut Pasteur scheme (<http://www.pasteur.fr>) and both the isolates were identified as ST730.

Resistance to carbapenems among *A. baumannii* isolates from Brazil has been mostly related to the production of OXA-23, followed by OXA-143 (Vasconcelos et al. 2015). In fact, OXA-72-producing *A. baumannii* isolates are still uncommon in Brazil. The first two cases of *A. baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-72</sub> gene were reported from São Paulo (Southeast Brazil) in 2011 (Antonio et al. 2011, Werneck et al. 2011). Two years later, this gene was reported in two other *A. baumannii* isolates from Recife (Northeast Brazil) (Cavalcanti et al. 2013). Recently, a surveillance study evaluated nine hospitals from five different states, representative of all the Brazilian regions, and described an inter-hospital dissemination of 10 *A. baumannii* isolates containing *bla*<sub>OXA-72</sub> in São Paulo (Vasconcelos et al. 2015). These data highlight the possibility of the spread of this gene in the country. Furthermore (Werneck et al. 2011), reported the presence of *bla*<sub>OXA-72</sub> gene inserted on a plasmid of ~ 86 kb, highlighting its potential for spread.

Here, we describe, for the first time, two *A. baumannii* isolates harbouring the *bla*<sub>OXA-72</sub> gene isolated from Rio Grande do Sul, southern Brazil. These data point towards the increasing diversity of oxacillinases among the clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Brazil. Recently, Cayô et al. (2015) deposited an OXA-23-producing isolate, *A. baumannii* ST730, in the Institut Pasteur database. ST730 is a single-locus variation of ST79 (CC79), responsible for the spread of *bla*<sub>OXA-23</sub> in Latin America (Chagas et al. 2014, Vasconcelos et al. 2015). It is worrisome that the emergent OXA-72-producing clones share the same phylogenetic origin with the clones harbouring *bla*<sub>OXA-23</sub> gene, since the latter demonstrated a remarkable capacity

doi: 10.1590/0074-02760160188

+ Corresponding author: mari.pag@hotmail.com

Received 2 May 2016

Accepted 27 June 2016

of dissemination and maintenance along the years in Brazilian hospitals (Pagano et al. 2015). The results presented in this study highlight the importance of monitoring the spread of successful clones associated with the dissemination of *A. baumannii* carrying *bla*OXA in Brazil by molecular epidemiology methods such as MLST.

#### REFERENCES

- Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, de Araujo MRE, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*OXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(3): 1322-3.
- Bou G, Cervero G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6(12): 635-3.
- Cavalcanti FLS, 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(30): 250-1.
- 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): 468-72.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Fourth Informational Supplement, CLSI document M100-S24. Wayne: CLSI; 2014.
- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35(3): 305.
- Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015; 36(7): 860-2.
- Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucaravski BR, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 83(4): 382-5.
- Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(2): 452-4.



**4.3 MANUSCRITO III - Mobile genetic elements related to carbapenem  
resistance in *Acinetobacter baumannii***

Artigo de revisão publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology*





## BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

<http://www.bjmicrobiol.com.br/>



### Review

## Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*

Mariana Pagano<sup>a,c</sup>, Andreza Francisco Martins<sup>b,c,\*</sup>, Afonso Luis Barth<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 5 November 2014

Accepted 11 February 2016

Available online xxx

Associate Editor: Jorge Luiz Mello Sampaio

##### Keywords:

*Acinetobacter baumannii*

Antimicrobial resistance

Mobile genetic elements

Carbapenem resistance

#### ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is widely recognized as an important pathogen associated with nosocomial infections. The treatment of these infections is often difficult due to the acquisition of resistance genes. *A. baumannii* presents a high genetic plasticity which allows the accumulation of these resistance determinants leading to multidrug resistance. It is highlighted the importance of the horizontal transfer of resistance genes, through mobile genetic elements and its relationship with increased incidence of multidrug resistant *A. baumannii* in hospitals. Considering that resistance to carbapenems is very important from the clinical and epidemiological point of view, the aim of this article is to present an overview of the current knowledge about genetic elements related to carbapenem resistance in *A. baumannii* such as integrons, transposons, resistance islands and insertion sequences.

© 2016 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Introduction

The *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Abc) complex has emerged as an important nosocomial pathogen. Among the members of this complex, *A. baumannii*, *A. pittii*, and *A. nosocomialis* are the three most common *Acinetobacter* species isolated in clinical settings.<sup>1</sup> *A. baumannii* has been extensively studied due to its association with infections of high mortality

rates. *A. pittii* and *A. nosocomialis* are increasingly identified as causative agents of nosocomial infections.<sup>2</sup>

*A. baumannii* is considered an important nosocomial pathogen, causing a wide range of infections, including ventilator-associated pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections and meningitis. This species is naturally highly resistant to a number of antimicrobials commonly used in the clinical practice, such as first and second generation cephalosporins, aminopenicillins, and chloramphenicol.

\* Corresponding author at: Av. Sarmiento Leite, 500/Prédio 12101, Bairro Farroupilha, Porto Alegre CEP 90050-170, Brazil.

E-mail: [andrezafm20@gmail.com](mailto:andrezafm20@gmail.com) (A.F. Martins).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>

1517-8382/© 2016 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*A. baumannii* contains an intrinsic AmpC  $\beta$ -lactamase (*bla*<sub>ADC</sub>) and OXA-51 serine-type oxacillinase (*bla*<sub>OXA-51</sub>), which contribute to the natural resistance to  $\beta$ -lactams.<sup>3</sup> Moreover, this organism presents a great capacity to acquire new resistance mechanisms, including those responsible for carbapenem resistance.<sup>4</sup>

Carbapenem resistance in *A. baumannii* involves mainly the carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases (CHDLs – Ambler class D) and less frequently, the metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs – Ambler class B). Carbapenem resistance may also be caused by other mechanisms such as, production of other carbapenemases, porin modification or loss, or by modification of the penicillin-binding proteins.<sup>4,5</sup>

Several acquired class D OXA-type  $\beta$ -lactamases have been identified as a source of carbapenem resistance in *A. baumannii*. Five main groups of CHDLs have been described in *A. baumannii*, corresponding to OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like and OXA-235-like enzymes.<sup>6</sup> OXA-23-like enzymes are the most widespread in *A. baumannii* worldwide and have been identified in all continents.<sup>6</sup>

In Brazil, OXA-23-like-producing *A. baumannii* is disseminated in many states and it is responsible for high endemic levels of multidrug-resistance.<sup>7,8</sup> The *bla*<sub>OXA-143</sub> gene has thus far been detected only in *A. baumannii* isolates from Brazil and is the second most frequent CHDL encoding gene.<sup>9-11</sup>

The *bla*<sub>OXA-143</sub> gene is frequently found in the Southeast region of Brazil, especially in the state of São Paulo. It is important to note that two new variants of this gene were recently described. The variants *bla*<sub>OXA-235</sub> and *bla*<sub>OXA-231</sub> were described in Minas Gerais and Paraná states, respectively.<sup>12,13</sup> This data demonstrates the detection of these new variants of *bla*<sub>OXA-143</sub> in Brazil is a cause of great concern and shows the potential of these new CHDLs to spread to other Brazilian regions.

Although *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> gene is disseminated in *A. baumannii* in Europe, in Brazil, this gene is still rare, with only a very few reports of a *bla*<sub>OXA-72</sub> (*bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> variant) in São Paulo,<sup>9</sup> Recife,<sup>14</sup> Porto Alegre and Curitiba.

Despite MBLs are less commonly identified in *A. baumannii* than the OXA-type carbapenemases, their hydrolytic activities to carbapenems are significantly more potent. Four MBLs have been identified in *A. baumannii*: IMP, VIM, SIM and, more recently, NDM.<sup>15</sup> It is important to note that MBL genes, such as NDM and IMP-1, have been described in *Acinetobacter non-baumannii* species, which demonstrates the capacity of these resistance genes to spread among different *Acinetobacter* species.<sup>16,17</sup>

Most of Ambler class A ESBLs possess activity against penicillins and broad-spectrum cephalosporins. However, specific GES variants have been shown to possess the ability to compromise the efficacy of carbapenems. Among *A. baumannii*, the variants GES-11 and GES-14 possess specific residues enlarging their hydrolysis spectrum (Table 1).<sup>18,19</sup>

The elevated genetic plasticity presented by *A. baumannii* has allowed the accumulation of many resistance determinants, which contributed to the high incidence of *A. baumannii* multiresistant to antibiotics. In this review, we present and discuss the characteristics of the different mobile genetic elements involved in the transfer of resistance determinants in *A. baumannii*.

## AbaR-type genomic resistance islands

Genomic islands containing resistance markers are referred to as resistance islands. Resistance islands have been described mainly in Proteobacteria, including *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, and more recently, in *A. baumannii*.<sup>20,21</sup> *A. baumannii* isolates harbor large clusters of horizontally transferred genes conferring resistance to multiple antibiotics and heavy metals, which are integrated at a specific site in a particular ATPase gene.<sup>22</sup>

Fournier et al. described for the first time the *A. baumannii* Resistant Island (AbaR). AbaR is defined as a region which has transposed into a specific position in the chromosome, creating a 5 bp duplication site (ACCGC).<sup>21</sup> The backbone of AbaR is comprised of five open reading frames (ORFs) – *orf1*, *tniA*, *tniB*, *orf2*, *orf3* – which constitute the transposition module, and two other genes encoding to the universal stress protein (*uspA*) and a sulfate permease (*sul*).<sup>21-23</sup>

Several AbaR have already been described containing a variety of resistance genes, including the *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, which confers resistance to carbapenems.<sup>24</sup> These resistance islands have been described in *A. baumannii* epidemic strains belonging to the important global clones, European Clone I (EC I) and European Clone II (EC II), known for their increased capacity to spread worldwide.<sup>22</sup>

Several other genomic resistance islands have been fully characterized in *A. baumannii*. The majority were found in strains of EC I, such as, AbaR1, AbaR3, AbaR5, AbaR6, AbaR7, AbaR8, AbaR9, and AbaR10. These AbaRs share a structure represented by a 16.3 kb backbone transposon (Tn6019) interrupted by a large compound transposon that contains a variable-resistance region bounded by directly oriented copies of Tn6018. Exceptions are AbaR6 and AbaR7, each with a large deleted region.<sup>25</sup> Much less is known about AbaRs in EC II. The resistance islands harbored by this clone are integrated at the same site of the ATPase gene as is known for AbaRs in EC I.<sup>25</sup>

AbaR1 is the largest resistance island described to date. This island contains 86 kb and was originally described in the epidemic *A. baumannii* strain AYE belonging to EC I. This strain was responsible for outbreaks in France during 2004.<sup>21</sup> *A. baumannii* AYE strain revealed the presence of a large gene cluster, containing many resistance determinants, inserted into the chromosome.<sup>21</sup>

Of the 45 resistance genes described in AbaR1 resistance island, 25 were associated with resistance to several classes of antibiotics. These include genes that had not been previously described in *Acinetobacter* species such as *strA*, *strB*, *aphA1*, and *aac69* (encoding resistance to aminoglycosides); putative tetracycline-resistance genes *tetA* (tetracycline efflux pump) and *tetR* (repressor protein); *dfrX* (resistance to cotrimoxazole); and the chloramphenicol-resistance gene *cmlA* (chloramphenicol efflux pump). Moreover, Fournier et al. (2006) described the presence of genes in AbaR1 that encode VEB-1 and OXA-10  $\beta$ -lactamases, the aminoglycoside acetyltransferase gene *aac3*, and the aminoglycoside adenylyltransferases *aadA1/DA1/B*; the cotrimoxazole resistance-associated *dfrI*; *cmlA5* and one copy of the chloramphenicol acetyl-transferase *cat*; the rifampin ADP-ribosyltransferase gene *arr-2*; and five

**Table 1 – Characterization of the main mobile genetic elements associated with resistance in *Acinetobacter baumannii*.**

Mobile genetic element	Resistance genes associated	Resistance profile	Geographic region	Reference
ISAb1	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	β-Lactams including carbapenems	Worldwide disseminated	Villalón et al., 2013 Mugnier et al., 2010 Mugnier et al., 2009
ISAb2	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> <i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	Carbapenems Cephalosporins	France Italy Spain	Villalón et al., 2013 Fernández Cuenca et al., 2012 Marqué et al., 2005
ISAb3	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	Carbapenems	China Italy Taiwan Lebanon	Villalón et al., 2013 Donnarumma et al., 2010 Zarrilli et al., 2008 Fu et al., 2014
ISAb4	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Carbapenems	France Belgium	Bogaerts et al., 2008 Corvec et al., 2007
ISAb10	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Carbapenems	Korea	Lee et al., 2011
ISAb125	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> <i>bla</i> <sub>NDM-2</sub> <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> <i>aphA6</i>	Carbapenems Cephalosporins Aminoglycosides	India Switzerland Greece Australia	Bonnin et al., 2012a Kaase et al., 2011 Mishra et al., 2013 Hamidian et al., 2012
IS18	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	Carbapenems	Lebanon Turkey	Villalón et al., 2013 Zarrilli et al., 2008 Marqué et al., 2005
Tn2006	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Carbapenems	Spain Tahiti France Turkey Vietnam Romania Lybia Australia	Mugnier et al., 2010 Corvec et al., 2007
Tn2007	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Carbapenems	France Algeria	Corvec et al., 2007
Tn2008	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Carbapenems	United Arab Emirates Bahrain	Mugnier et al., 2010
Int1	<i>bla</i> <sub>GES-11</sub> <i>bla</i> <sub>GES-14</sub> <i>dfrA1</i> <i>sat2</i> <i>aadA1</i> <i>orfX</i> <i>ybfA</i> <i>ybfB</i>	β-Lactams including carbapenems Aminoglycosides	Europe (widespread) Korea Iran Brazil	Bonnin et al., 2011 Nemec et al., 2004 Lee et al., 2005 Japoni-Nejad et al., 2013 Mendes et al., 2007
Int2	<i>dfrA1</i> <i>sat2</i> <i>aadA1</i> <i>orfX</i> <i>ybfA</i> <i>ybfB</i> <i>ybgA</i>	Aminoglycosides	Argentina Chile Brazil	Pagano et al., 2012 Ramirez et al., 2012 Fonseca et al., 2011

copies of the sulfonamide-resistance gene *sulI* encoding dihydropteroate synthetase, a component of class 1 integrons.<sup>21,26</sup>

AbaR2 was described in the epidemic, multidrug-resistant *A. baumannii* strain named ACICU.<sup>27</sup> This strain belongs to ECII and carries the plasmid-mediated *bla*<sub>OXA-58</sub>. *A. baumannii* AYE and ACICU belong to different clonal groups (European clones I and II, respectively), however, the presence of related resistance islands in both lineages suggests that AbaR1 and AbaR2 derived from an island acquired by a common *A. baumannii* ancestor before their divergence into two different clonal lineages.<sup>21,27</sup>

The genomic resistance island variant AbaR3 appears to be an ancestral of several AbaR variants which have arisen from AbaR3 by loss of segments of different lengths that include one or more of the antibiotic resistance genes.<sup>28</sup> AbaR3 contains eight genes associated with antibiotic resistance. Unique sequences in AbaR3 include a *bla*<sub>TEM</sub> gene that is associated with a Tn3 transposon and a small cluster of genes, including two that encode to a DNA topoisomerase and a single-strand binding protein that are similar to proteins from a broad-host-range plasmid.<sup>29</sup> In addition, it is noteworthy that the presence of genes for a plasmid-derived

176 DNA topoisomerase may contribute to the resistance island  
177 mobility.

## Transposable elements

178 Transposable elements have the ability to move within the  
179 bacterial genome, being able to translocate themselves from  
180 one site of the genome to other sites. These transpositions  
181 are considered one of the major causes of bacterial DNA  
182 rearrangements, which in turn can cause changes in gene  
183 expression.<sup>30</sup> In *A. baumannii*, transposable elements, such  
184 as transposons and insertion sequences have been responsi-  
185 ble for the expression and spread of antimicrobial resistance  
186 mechanisms.<sup>1</sup>

## Insertion sequences

187 Bacterial insertion sequences (IS) are the least complex type  
188 of transposable elements; they rarely exceed 2 kb in size and  
189 may be as small as 0.5 kb. These elements possess an impor-  
190 tant role in the spread of resistance genes since the presence  
191 of two copies of the same IS flanking a resistance gene form  
192 a complex structure called composite transposon. Composite  
193 transposons are able to mobilize a variety of resistance genes,  
194 contributing to antimicrobial resistance dissemination.<sup>31</sup>

195 Besides their transposition role, some IS have been shown  
196 to activate or to increase the expression of neighbor genes.  
197 This capacity may be due to the presence of promoter regions  
198 in the insertion sequence or by the formation of new promo-  
199 ters after the insertion event.<sup>31</sup>

200 Some IS elements have an important role in *A. bauman-*  
201 *nii* antimicrobial resistance. IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*Aba4*  
202 and IS18 are commonly associated with the expression of  
203 carbapenemases genes in *A. baumannii* (Table 1).<sup>32</sup> Villalón  
204 et al. (2013) investigated the presence of these IS elements in  
205 59 multidrug-resistant *A. baumannii* isolates and observed a  
206 prevalence of 93.2%, 25.4%, 20.3% and 5.1% for IS*Aba1*, IS*Aba2*,  
207 IS*Aba3* and IS18, respectively. IS*Aba4* was not detected in any  
208 of the isolates in this study.<sup>32</sup>

209 It is important to note that IS elements such as IS*Aba1*  
210 can contribute to the spread of carbapenemase genes among  
211 different *Acinetobacter* species. Poirel et al. (2008) hypoth-  
212 esized that *bla*<sub>OXA-23</sub> was likely mobilized by the IS*Aba1*  
213 insertion sequence from *A. radioresistens* to *A. baumannii*.<sup>33</sup> The  
214 authors demonstrated that *A. radioresistens* is the progenitor  
215 of the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> gene, which was mobilized to *A. baumannii*  
216 through IS*Aba1* insertions sequence provided by *A. bauman-*  
217 *nii*. This hypothesis is based on the identification of genes  
218 encoding both OXA-23-like and ATPase-like enzymes on the *A.*  
219 *radioresistens* chromosome without the presence of IS*Aba1* ele-  
220 ments, that is involved in the mobilization of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene.<sup>33</sup>

221 The IS*Aba1* element belongs to the IS4 family and has 11-  
222 bp inverted repeats sequences flanked by 9-bp direct repeats  
223 of the target sequence. Although this element is considered  
224 exclusive to *A. baumannii*, Segal et al. (2005) identified IS*Aba1* in  
225 *Acinetobacter lwoffii* isolates, demonstrating the high mobility  
226 of these elements and indicating that transposition events of  
227 the IS*Aba1* occur frequently.<sup>34</sup>

IS*Aba1* has been found upstream the *bla*<sub>OXA-23-like</sub>,  
*bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>AmpC</sub> genes in *A. bauman-*  
*nii*. This IS acts as a promoter sequence which increases  
the expression of resistance genes. In fact, it was demon-  
strated that it is necessary the presence of IS*Aba1* upstream  
*bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-51</sub> for these genes to confer resistance  
to carbapenems.<sup>35</sup> Although several authors have demon-  
strated the relationship between IS*Aba1* upstream *bla*<sub>OXA-51</sub>  
and carbapenem resistance, this may not be enough to confer  
resistance, as *A. baumannii* isolates susceptible to carbapen-  
ems with the association IS*Aba1*/*bla*<sub>OXA-51</sub> have already been  
described.<sup>36</sup>

The IS*Aba2*, IS*Aba3* and IS*Aba4* elements have also been  
identified upstream *bla*<sub>OXA-58-like</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in *A.*  
*baumannii* isolates.<sup>37</sup> Giannouli et al. (2009) analyzed the inser-  
tion sequences of 24 *A. baumannii* isolates with *bla*<sub>OXA-58</sub> gene  
and identified the presence IS*Aba2*, IS18 or IS*Aba1* located at  
the 5' end, while at 3' end all isolates presented the IS*Aba3*  
element. Of note, the IS elements at 5' end of *bla*<sub>OXA-58</sub> were  
evidenced in strains of distinct PFGE profiles and ST groups in  
the same geographical area. It suggests that these elements  
might have been acquired through horizontal gene transfer  
and confirms their dissemination capacity among *A. bauman-*  
*nii* isolates.<sup>38</sup>

Corvec et al. (2007) described the first *A. baumannii* iso-  
late harboring an IS*Aba4* element upstream *bla*<sub>OXA-23</sub> gene, in  
France. Subsequently, it was shown that an isolate from Bel-  
gium containing the association of IS*Aba4* and the *bla*<sub>OXA-23</sub>  
presented the same PFGE profile as the isolate from France.  
These findings demonstrate the propensity of resistant strains  
to spread, highlighting the importance of epidemiological sur-  
veys to estimate the true prevalence of isolates harboring  
IS*Aba4*/*bla*<sub>OXA-23</sub>.<sup>39,40</sup>

Lee et al. (2011) identified a novel 1203bp insertion  
sequence, named IS*Aba10*. This element was found to be  
inserted into the IS*Aba1* element upstream *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in  
an *A. baumannii* presenting high minimum inhibitory con-  
centrations (MICs) to carbapenems ( $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ ). In addition,  
isolates without the insertion of this element showed MICs  
between 8 and 16  $\mu\text{g/mL}$ . The authors suggested that this  
sequence may increase 2–5-fold the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene expression.  
Based on these results, they suggested that the IS*Aba10* ele-  
ment may play an important role in carbapenem resistance  
by providing an additional promoter sequence to the *bla*<sub>OXA-23</sub>  
gene.<sup>41</sup>

IS elements have also been associated to metallo- $\beta$ -  
lactamases such as *bla*<sub>NDM</sub>, which have been increasingly  
reported in *Acinetobacter baumannii* and in other *Acinetobac-*  
*ter* species such as *A. johnsonii*, *A. pittii*, *A. junii* and *A.*  
*lwoffii*.<sup>16,42–44</sup> The *bla*<sub>NDM</sub> can be located either on the plas-  
mid or chromosome in *Acinetobacter* species.<sup>44</sup> However, it was  
evidenced that the spread of the *bla*<sub>NDM</sub> gene was not associ-  
ated with clonal dissemination, but horizontal spread of the  
genetic structure.<sup>42</sup>

Several studies reported that *bla*<sub>NDM</sub> gene is located  
between two copies of the IS*Aba125* element, forming a com-  
posite transposon named Tn125. IS*Aba125* element provides  
the -35 sequence of the hybrid promoter responsible for the  
expression of the *bla*<sub>NDM</sub> gene.<sup>45</sup> Curiously, this IS element  
has been originally identified from an *A. baumannii* isolate

without any association with the *bla<sub>NDM</sub>* gene. By contrast, this IS has been identified in *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa* as a remnant of the Tn125 and has never been identified alone in these species. This observation suggests that *A. baumannii* is a likely reservoir of IS*Aba*125. Findings like these highlight that even though *A. baumannii* is usually recognized as a final acceptor for resistance genes, it may acquire several resistance determinants and then transfer them to *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp.

Recently, a study demonstrated that Tn125 has been disrupted by IS26 in *A. baumannii* NDM-producing isolates from India. This new rearrangement has resulted in *bla<sub>NDM-1</sub>* being within an IS26 composite transposon, which might potentially mobilize *bla<sub>NDM-1</sub>* and contribute to the spread of the carbapenemase gene.<sup>46</sup>

Robledo et al. (2010) described the first report of *bla<sub>KPC</sub>* gene in *A. baumannii* isolates from Puerto Rico. In that study, four variants of *bla<sub>KPC</sub>* were identified: KPC-2, -3, and -4 and a novel variant, KPC-10. The integration of these genes in the *A. baumannii* chromosome was related to a transposition event mediated by the transposase of ISE*cp1*.<sup>31,47</sup> This element is likely to be responsible for mobilizing numerous *bla<sub>CTX-M</sub>* genes and several other resistance genes such as *qnrB19*, *rmtC*, *bla<sub>ACC-1</sub>* and *bla<sub>CMY-2g7,16,21</sub>*.<sup>48</sup> In addition, it was responsible for the mobilization of *bla<sub>CTX-M-5</sub>* from a narrow range plasmid to the chromosome of *A. baumannii*, event similar to what Martinez et al. observed with *bla<sub>KPC</sub>* gene.<sup>47</sup>

As described above, ISs can cause insertion mutations, genome rearrangements and enhance the spread of resistance and virulence determinants within pathogenic species. Besides being involved in the expression and spread of carbapenemases, IS elements such as IS*Aba*1, IS*Aba*10 and IS*Aba*825 are involved on the disruption of *carO* gene, which codes for an important outer membrane channel. The absence of this outer membrane protein has been correlated with reduced susceptibility to carbapenems.<sup>41,49,50</sup>

## Transposons

Transposons sequences may vary in size from 3 to 40 kb, in some cases containing dozens of genes. These elements are into two main classes: composite transposons or complex transposons. Composite transposons have resistance genes in its central region; furthermore, these elements are flanked by an insertion sequence (IS) at each end. Complex transposons have a more complicated genetic structure than IS elements or composite transposons. The classic complex transposon is Tn3, which is derived from resistance plasmid R1.<sup>51</sup>

In *A. baumannii*, transposons have been characterized as genetic structures harboring important resistant genes, such as *bla<sub>OXA-23</sub>*. Three transposons have been related to *bla<sub>OXA-23</sub>*: Tn2006, Tn2007 and Tn2008. In Tn2006, the *bla<sub>OXA-23</sub>* gene is flanked by two copies of the insertion sequence IS*Aba*1, which is located in opposite directions. Tn2008 is similar to Tn2006 but lacks the second copy of IS*Aba*1. Finally, in Tn2007 the *bla<sub>OXA-23</sub>* gene is associated with one copy of IS*Aba*4 located upstream to this gene.<sup>52</sup> Several studies have demonstrated that Tn2006 is currently the most common determinant of

carbapenem resistance, with a great ability to spread among *A. baumannii* isolates.<sup>53</sup>

## Integrans

These elements are natural cloning and expression systems that incorporate ORFs by site-specific recombination and convert them to functional genes due to the presence of a promoter sequence (Rowe-Magnus et al., 2001). It is now well established that these mobile elements constitute the major vectors of antibiotic multiresistance in Gram-negative and, to a lesser extent, in Gram-positive bacteria.<sup>54</sup>

Five different classes of mobile integrans have been defined to date, based on the sequence of the encoded integrases.<sup>54,55</sup> It is known that three (classes 1, 2 and 3) of these classes have an important role in the dissemination of antimicrobial resistance genes.<sup>55,56</sup> These classes are well described in the literature and are associated to multiresistant phenotypes.<sup>54,55</sup>

Several studies have demonstrated a high prevalence of class 1 integrans in *A. baumannii* isolates in Europe, Asia and United States.<sup>57</sup> Due to its greater spread capacity, class 1 integrans are the main experimental model of integrans. This class is usually associated to functional or non functional transposons derived from Tn402 which may be inserted into larger transposons as Tn21. Class 1 integrans have been associated to a variety of insertion sequences, including IS26, IS1999, IS2000 e IS6100.<sup>58</sup>

Most acquired MBL genes in *A. baumannii* have been found within class 1 integrans, often containing an array of resistance gene cassettes.<sup>1,6</sup> Mendes et al. (2007) described seven *bla<sub>IMP-1</sub>* harboring *Acinetobacter* spp. isolates recovered from Brazilian inpatients. All isolates possessed a class 1 integron, named In86, carrying the same cassette array: *bla<sub>IMP</sub>*, *aac(6')-31*, and *aadA1*, which was plasmid-located in five of the isolates (Mendes et al., 2007). This gene cassette contained a aminoglycoside resistance gene – *aac(6')-31* – that might be capable of conferring resistance to all clinically available aminoglycosides. This gene was able to disseminate among unrelated *A. baumannii* clinical isolates from a Brazilian hospital (Mendes et al., 2007). Recently, Cayô et al., reported a new structure of class 1 integron, In990, harboring the *bla<sub>IMP-10</sub>* in *A. baumannii* isolates from Brazil. The cassette arrangement of In990 was very similar to that of In86 described by Mendes et al.<sup>59,60</sup>

Class 2 integrans are included in the Tn7 family of transposons, and consist of an integrase gene followed by gene cassettes. Tn7 are identified as a sophisticated mobile genetic element containing a transposition module formed by five transposition genes, *tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD*, and *tnsE*, rather than the one or two seen in many other transposable elements.<sup>56</sup> Class 3 integrans are less prevalent than class 2 and are also located in transposons.<sup>54</sup>

Despite reports of a higher prevalence of class 1 integrans in *A. baumannii*, studies conducted in Latin American countries such as Chile, Argentina and Brazil demonstrated a greater distribution of class 2 integrans among isolates of *A. baumannii* in these regions.<sup>36,61</sup> Fonseca et al. (2011) demonstrated that all class 2 integrans obtained from Brazilian isolates

were inserted into Tn7 transposon, besides having the gene cassette containing the arrangement of genes *dfrA1* (trimethoprim resistance), *sat2* (streptothricin resistance) and *aadA1* (spectinomycin and streptomycin resistance).<sup>62</sup>

Martins et al. (2015) investigated the association of class 2 integrons and gene cassettes with clonal lineages of *A. baumannii*. They reported the association of class 1 and 2 integrons with CC109/1 (International Clone I) and CC113/79 *A. baumannii* strains, respectively. The authors hypothesized that class 2 integron, predominant in Latin America, may be accounted for the high prevalence of the CC113/79 type. In the same study, a similar prevalence was observed for *A. nosocomialis*.<sup>63</sup>

Class 1 and 2 integrons have been described in *A. baumannii* isolates related to nosocomial infection outbreaks. In a study published by Turton et al. (2005), it was observed that all *A. baumannii* isolates associated with outbreaks contained class 1 integrons, in contrast, none sporadic isolate presented this class of integron.<sup>64</sup>

More than 130 different gene cassettes containing resistance genes have been identified in integrons. Distinct genes are evidenced in gene cassettes, promoting resistance to a variety of antimicrobial classes. Together, these gene cassettes provide resistance to most classes of antibiotics including  $\beta$ -lactams, all aminoglycosides, chloramphenicol, trimethoprim, streptothricin, rifampin, erythromycin, fosfomycin, lincomycin, quinolones, and antiseptics of the quaternary ammonium-compound family.<sup>65</sup> Besides these genes, several ORFs with unknown function have been identified in gene cassettes.<sup>66</sup>

In *A. baumannii*, gene cassettes have been described containing several genes, such as *aacA4* responsible for resistance to amikacin, netilmicin and tobramycin, the *catB8* gene is an acetyltransferase which encodes resistance to chloramphenicol, *aadA1* is responsible for resistance to streptomycin and spectinomycin, *aac3* responsible for resistance to gentamicin and *bla<sub>OXA-10</sub>* encodes resistance to  $\beta$ -lactams, except carbapenems and extended-spectrum cephalosporins.<sup>21</sup>

## Final remarks

This review highlighted the role of resistance determinants in the capacity of spread in *A. baumannii*. This species shows a considerable ability to acquire foreign DNA such as drug resistance genes, which provide a genetic diversity and overcomes the antibiotic selection pressure. It is important to note that the main carbapenem-resistance mechanism involved in *A. baumannii* (production of oxacillinases) presents a low hydrolytic power when it is not associated with an insertion sequence. Moreover, the capacity of OXA genes to spread is directly related to their association with a composite transposon (Tn2006). These features highlight the importance of investigating the genetic context of these genes in order to define their real clinical significance.

The continuous description of gene cassettes in integrons, mainly those leading to resistance to  $\beta$ -lactams and aminoglycosides, has been of great concern. Furthermore, the number of resistance genes inserted in the same plasmid, even in the same integron, seems to be increasing. This integration of resistance determinants in the same plasmid may facilitate

the persistence in the environment for long periods because of the physical association of integrons with other elements, allowing their continued selection.<sup>57</sup>

In this context, the knowledge about the genetic structure of resistance determinants is very important in order to understand the capacity of resistance genes to spread in *A. baumannii*.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:538-582.
2. Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1445-1449.
3. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:826-836.
4. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:105-114.
5. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:219-226.
6. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:568-585.
7. Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36:860-862.
8. Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83:382-385.
9. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araujo MR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla<sub>OXA-143</sub>* gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1322-1323.
10. Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:452-454.
11. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5035-5038.
12. Gionco B, Pelayo JS, Venancio EJ, Cayo R, Gales AC, Carrara-Marroni FE. Detection of OXA-231, a new variant of *bla<sub>OXA-143</sub>*, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2531-2532.
13. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. First isolation of the *bla<sub>(OXA-23)</sub>* carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:578-579.



- 515 14. de Sa Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Moraes Junior  
516 MA, de Moraes MM, Leal-Balbino TC. Emergence of  
517 extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter*  
518 *baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination?  
519 *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77:250-251.
- 520 15. Abbott I, Cerqueira GM, Bhuiyan S, Peleg AY. Carbapenem  
521 resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges,  
522 mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Rev*  
523 *Anti Infect Ther*. 2013;11:395-409.
- 524 16. Pagano M, Poirel L, Martins AF, et al. Emergence of  
525 NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob*  
526 *Agents*. 2015;45:444-445.
- 527 17. Lu PL, Huang LY, Lian ST, et al. How carbapenem-resistant  
528 *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed  
529 hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:463-466.
- 530 18. Moubareck C, Bremont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T.  
531 GES-11, a novel integron-associated GES variant in  
532 *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*.  
533 2009;53:3579-3581.
- 534 19. Bogaerts P, Naas T, Garch FE, et al. GES extended-spectrum  
535  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium.  
536 *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:4872-4878.
- 537 20. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial  
538 pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:14-56.
- 539 21. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics  
540 of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS*  
541 *Genet*. 2006;2:e7.
- 542 22. Post V, White PA, Hall RM. Evolution of AbaR-type genomic  
543 resistance islands in multiply antibiotic-resistant  
544 *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*.  
545 2010;65:1162-1170.
- 546 23. Seputiene V, Povilonis J, Suziedeliene E. Novel variants of  
547 AbaR resistance islands with a common backbone in  
548 *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II.  
549 *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1969-1973.
- 550 24. Zhu L, Yan Z, Zhang Z, et al. Complete genome analysis of  
551 three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for  
552 insight into the diversification of drug resistance elements.  
553 *PLOS ONE*. 2013;8:e66584.
- 554 25. Krizova L, Dijkshoorn L, Nemeč A. Diversity and evolution of  
555 AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii*  
556 strains of European clone I. *Antimicrob Agents Chemother*.  
557 2011;55:3201-3206.
- 558 26. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. AbaR-type transposon  
559 structures in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*.  
560 2012;67:234-236.
- 561 27. Iacono M, Villa L, Fortini D, et al. Whole-genome  
562 pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant  
563 *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European  
564 clone II group. *Antimicrob Agents Chemother*.  
565 2008;52:2616-2625.
- 566 28. Krizova L, Nemeč A. A 63 kb genomic resistance island found  
567 in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of  
568 European clone I from 1977. *J Antimicrob Chemother*.  
569 2010;65:1915-1918.
- 570 29. Adams MD, Goglin K, Molyneux N, et al. Comparative  
571 genome sequence analysis of multidrug-resistant  
572 *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2008;190:8053-8064.
- 573 30. Lewin B. Transposons. In: Hall PP, ed. *Genes VIII*. 8th ed. NJ:  
574 Upper Saddle River; 2004:467-480.
- 575 31. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol*  
576 *Biol Ver*. 1998;62:725-774.
- 577 32. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel  
578 A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived  
579 cephalosporinase: carbapenem-hydrolyzing oxacillinase and  
580 metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion  
581 sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*  
582 from Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:550-553.
- 583 33. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Garattoli A, Nordmann P.  
584 *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem  
585 resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*.  
586 2008;52:1252-1256.
- 587 34. Segal H, Garmy S, Elisha BG. Is IS(Aba-1) customized for  
588 *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243:425-429.
- 589 35. Turton JE, Ward ME, Woodford N, et al. The role of ISAbal in  
590 expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter*  
591 *baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;258:72-77.
- 592 36. Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL.  
593 Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the  
594 ISAbal1 upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre:  
595 southern Brazil. *Epidemiol Infect*. 2012;141:1-4.
- 596 37. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of  
597 acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing  
598 oxacillinase gene bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*.  
599 *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1442-1448.
- 600 38. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, et al. Molecular  
601 epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter*  
602 *baumannii* strains in intensive care units of multiple  
603 Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother*.  
604 2009;63:828-830.
- 605 39. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics  
606 and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase  
607 gene bla(OXA-23) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob*  
608 *Agents Chemother*. 2007;51:1530-1533.
- 609 40. Bogaerts P, Cuzon G, Naas T, et al. Carbapenem-resistant  
610 *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the bla(OXA-23)  
611 gene associated with ISAbal4 in Belgium. *Antimicrob Agents*  
612 *Chemother*. 2008;52:4205-4206.
- 613 41. Lee Y, Kim CK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. A novel  
614 insertion sequence: ISAbal10, inserted into ISAbal1 adjacent  
615 to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane  
616 protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob*  
617 *Agents Chemother*. 2011;55:361-363.
- 618 42. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, et al. Dissemination of New  
619 Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter*  
620 *baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:E362-E365.
- 621 43. Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, et al. First report of  
622 NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25  
623 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:7592-7594.
- 624 44. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of  
625 the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria.  
626 *Biomed Res Int*. 2014;2014:249856.
- 627 45. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome  
628 of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli*  
629 strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob*  
630 *Agents Chemother*. 2011;55:4224-4229.
- 631 46. Jones LS, Toleman MA, Weeks JL, Howe RA, Walsh TR,  
632 Kumarasamy KK. Plasmid carriage of bla NDM-1 in clinical  
633 *Acinetobacter baumannii* isolates from India. *Antimicrob Agents*  
634 *Chemother*. 2014;58:4211-4213.
- 635 47. Martinez T, Vazquez GJ, Aquino EE, Martinez I, Robledo IE.  
636 ISEcp1-mediated transposition of blaKPC into the  
637 chromosome of a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*  
638 from Puerto Rico. *J Med Microbiol*. 2014;63:1644-1648.
- 639 48. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion  
640 sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol*  
641 *Rev*. 2011;35:912-935.
- 642 49. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance  
643 to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of  
644 *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a  
645 gene encoding a member of a novel family of beta-barrel  
646 outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*.  
647 2005;49:1432-1440.
- 648 50. Ravasi P, Limansky AS, Rodriguez RE, Viale AM, Mussi M.A.  
649 ISAbal825 a functional insertion sequence modulating  
650 genomic plasticity and bla(OXA-58) expression in

- 651 *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:917–920. 680
- 652 51. Woodford N, Johnson A. *Methods in Molecular Biology: Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology*. vol. 266. Towota, 681
- 653 NJ: Humana Press; 2005. 682
- 654 52. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide 683
- 655 dissemination of the *bla*(OXA-23) carbapenemase gene of 684
- 656 *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:35–40. 685
- 657 53. Lee HY, Chang RC, Su LH, et al. Wide spread of Tn2006 in an 686
- 658 AbaR4-type resistance island among carbapenem-resistant 687
- 659 *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J* 688
- 660 *Antimicrob Agents.* 2012;40:163–167. 689
- 661 54. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet.* 690
- 662 2010;44:141–166. 691
- 663 55. Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol* 692
- 664 *Mol Biol Rev.* 2014;78:257–277. 693
- 665 56. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev* 694
- 666 *Microbiol.* 2006;4:608–620. 695
- 667 57. Lee YT, Huang LY, Chen TL, et al. Gene cassette arrays: 696
- 668 antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of 697
- 669 *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 698
- 670 integrons. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42:210–219. 699
- 671 58. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and 700
- 672 super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:272–288. 701
- 673 59. Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, 702
- 674 Walsh TR. Characterization of an integron carrying *bla*IMP-1 703
- 675 and a new aminoglycoside resistance gene: *aac*(6′)-31, and 704
- 676 its dissemination among genetically unrelated clinical 705
- 677 isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 706
- 678 2007;51:2611–2614. 707
- 679 60. Cayo R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Jove T, 680
- 681 Gales AC. Identification of a new integron harboring 682
- 683 *bla*(IMP-10) in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* 684
- 685 clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 686
- 686 2015;59:3687–3689. 687
- 687 61. Gonzalez G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, 688
- 689 Zemelman R. Presence of integrons in isolates of different 689
- 690 biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. 691
- 691 *FEMS Microbiol Lett.* 1998;161:125–128. 692
- 692 62. Fonseca EL, Freitas FD, Scheidegger EMD, Jacinto T, Vicente 693
- 693 ACP. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter* 694
- 694 *baumannii* circulating in different Brazilian geographic 695
- 695 regions. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:95–96. 696
- 696 63. Martins N, Picao RC, Adams-Sapper S, Riley LW, Moreira BM. 697
- 697 Association of class 1 and 2 integrons with 698
- 698 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international 699
- 699 clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob* 700
- 700 *Agents Chemother.* 2015;59:698–701. 701
- 701 64. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, et al. Detection and typing 702
- 702 of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* 703
- 703 found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 704
- 704 2005;43:3074–3082. 705
- 705 65. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Integrons: natural tools for 706
- 706 bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* 707
- 707 2001;4:565–569.
66. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes 708
- and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS* 709
- Microbiol Rev.* 2009;33:757–784.

**4.4 MANUSCRITO IV- Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to high-risk clones (CC15 and CC79) in different Brazilian states**

Manuscrito a ser submetido na revista *Clinical Microbiology and Infection*



Research Note

**Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to high-risk clones (CC15 and CC79) in different Brazilian states**

M. Pagano<sup>1,2\*</sup>, L. Rocha<sup>2,3\*</sup>, J. L. M. Sampaio<sup>3</sup>, A. F. Martins<sup>2,4</sup>, A. L. Barth<sup>1,2</sup>

\*Authors contributed equally

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Grupo Fleury, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Running title: *A. baumannii* carrying OXA-72 belonging to CC15 and CC79

Corresponding Author: Mariana Pagano, MSc

Address: Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil

Email address: mari.pag@hotmail.com

Phone: (55)(51)33598607

**Abstract**

This study evaluated the genetic relationship of eleven *A. baumannii* OXA-72 producers obtained from three different Brazilian states. REP-PCR analysis showed the presence of three clonal groups (A, B and C) and MLST (Institute Pasteur) demonstrated that the isolates belonged to five different sequence types: ST79, ST180, ST730 and the new ST890 and ST891. Data analysis demonstrated that the isolates belonged to the epidemic clonal complexes CC15 (ST180 and ST890), CC79 (ST79 and ST730) and ST891 as a singleton. Furthermore, we observed that class 1 and 2 integrons were associated with CC15 and CC79, respectively. Here, we report for the first time the epidemic clonal complex CC15 related to *Acinetobacter baumannii* OXA-72 producing isolates.

Carbapenem resistance has been continuously reported worldwide among *Acinetobacter baumannii* isolates, limiting the treatment options and causing major therapeutic problems. Acquired carbapenem resistance in *A. baumannii* is frequently associated with Ambler class D carbapenemase, mainly *bla*OXA-23. Until now, there are only few reports of other oxacilinases, such as *bla*OXA-72 in Brazil [1, 2].

Multilocus sequence typing (MLST) is considered the gold standard for investigation of population structure and global *A. baumannii* epidemiology. In Brazil, most carbapenem resistant *bla*OXA-23-producing *A. baumannii* have been associated with clonal complexes CC79 and CC15 (Institute Pasteur) [3, 4].

In the present study we report for the first time the epidemic clonal complex CC15 associated with *A. baumannii* carrying *bla*OXA-72. Furthermore, we describe the spread of *A. baumannii* high-risk clones (CC79 and CC15) carrying *bla*OXA-72 gene in three Brazilian states.

As part of a surveillance study performed by our research group (Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS) we evaluated a total of 94 *A. baumannii-calcoaceticus* isolates from four Brazilian states (São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and Paraná) from April to October 2013. The isolates were screened for oxacilinases genes (*bla*OXA-23, *bla*OXA-24/40, *bla*OXA-51, *bla*OXA-58, and *bla*OXA-143) by multiplex PCR [5]. Furthermore, class 1 and class 2 integrons were detected by PCR using primers to the integrase gene [6]. A total of 11/94 (11.7%) isolates from three states (São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul) presented positive results for the *bla*OXA-24/40 gene, identified by sequencing as variant *bla*OXA-72 (ABI 3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City,

United States). Species identification was performed using mass spectrometry (MALDI-TOF) and a *gyrB* multiplex PCR [7].

Clonal diversity was investigated by repetitive-sequence-based polymerase chain reaction (REP-PCR) using REP-1 and REP-2 primers (59- IIIIGCGCCGICATCAGGC- 39 and 59- ACGTCTTATCAGGCCTAC- 39) [8]. REP-PCR products were separated in agarose gel (1.7%) electrophoresis in 0.5X TBE buffer. Results were interpreted according to a dendrogram constructed on BioNumerics® V6.5 software using the Dice similarity coefficient and the unweighted-pair group method using arithmetic averages (UPGMA) with 1% optimization and 1% position tolerance. For the purpose of this study, isolates with  $\geq$  80% of similarity were considered as part of a major cluster (clone). The OXA-72 *A. baumannii* producers were typed using the MLST scheme from Pasteur Institute (IP) (<http://www.pasteur.fr>) by DNA sequencing of internal regions of 7 housekeeping genes (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, and *rpoB*). DNA sequencing was performed with Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and nucleotide sequences were aligned by the BioEdit sequence alignment. Analyses of the allele sequences and sequence type (ST) were performed through the *A. baumannii* MLST Institute Pasteur Web site (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). The relationship among the new and existing STs was evaluated by the use of the eBURST program (<http://eburst.mlst.net/>) in order to determinate clonal relation of *A. baumannii* carrying *bla*OXA-72 among different states.



All the *bla*OXA-72-producing isolates were identified as *A. baumannii*. REP-PCR analysis showed the presence of three clonal groups (A, B and C) and MLST demonstrated that the isolates belonged to five different sequence types: ST79, ST180, ST730 and the new ST890 and ST891 (Table). According to MLST data analysis and eBURST algorithm, the isolates belonged to the epidemic clonal complexes CC15 (ST180 and ST890), CC79 (ST79 and ST730) and ST891 as a singleton. CC15 was restricted to the state of Paraná, and CC79 was present in Rio Grande do Sul and São Paulo states. Class 1 integrons were detected in all isolates belonging to CC15, and all isolates of CC79 presented class 2 integrons (Table).

*A. baumannii* is characterized by a remarkable capability to acquire antibiotic resistance determinants, intra- and inter-hospital outbreak spread, and national and international clonal dissemination. Worldwide dissemination of multidrug-resistant *A. baumannii* OXA-23-producers has been associated with specific clones, such as International Clone 1 (CC1IP), International Clone 2 (CC2IP) and CC15IP [9]. In Brazil, the widespread of CC79 and CC15 have been associated with *bla*OXA-23 production in different states [1, 4]. Furthermore Stietz et al reported that ST79 is also frequently observed among OXA-23-producing *A. baumannii* isolates in Argentina, demonstrating the dissemination of this CC79 not only in Brazil, but also in South America countries [10]. The same study demonstrated the dissemination of *bla*OXA-72 related to the epidemic clone CC79 [10].

*A. baumannii* belonging to CC15 have experienced evolutionary success and usually exhibit multidrug resistant phenotypes, which facilitated their rapid clonal expansion in the recent years. This clonal complex has been related to OXA-23

outbreaks in several European countries, including Italy, Spain, Greece, and Turkey, and in South America [9]. To the best of our knowledge, this is the first description of CC15 associated with OXA-72 production in the world.

The screening for integrase genes demonstrated the presence of class 1 and 2 integrons associated with CC15 and CC79, respectively (Table). Interestingly, Martins et al showed the same distribution of integron classes 1 and 2, related to specific CCs, such as CC15 and CC79 [11]. In a publication of our research group, it was demonstrated the high prevalence of class 2 integrons in Southern Brazil. Indeed, these results might be explained by the association of class 2 integrons to CC79, prevalent in South America [12].

The OXA-72 enzyme was first identified in *A. baumannii* from Thailand, in 2004. Later on, this enzyme was reported in *Acinetobacter* spp. clinical isolates from China, South Korea, Taiwan, Italy, Spain and France [13]. Until the moment, there are only few reports of *A. baumannii* carrying the *bla*OXA-72 gene in Brazil [1,14]. In the present study, we described the association of *A. baumannii* carrying *bla*OXA-72 with the epidemic clones CC15, CC79, and a new ST (ST 891). Camargo et al described *bla*OXA-72 producers of CC79 in Brazil [3]. The data presented in our study, demonstrated not only the association of *bla*OXA-72 producers to CC79, but also to CC15. The ability of these particular clones to acquire antibiotic resistance should call attention for the necessity of monitoring studies on the molecular epidemiology of OXA-72-producing isolates in order to prevent further outbreaks as was observed with *bla*OXA-23 [15, 16]. This data points to the potential for this gene to spread among different countries and distinct geographical regions. With this in

mind, more studies are needed to evaluate the incidence of the emerging international clones in South America.

## References

1. 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: 385-5.
2. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol and Infect* 2006; 12: 826-36.
3. Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, Vasconcellos FM, 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.
4. Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 468-72.
5. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 305-14.

6. Koeleman JGM, Stoof J, Van der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 8-13.
7. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4592-4.
8. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-43.
9. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen O. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 2012; 15: 237-47.
10. Stietz MS, Ramírez MS, Vilacoba E, Merkier AK, Limansky AS, Centrón D, et al. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 294–301.
11. Martins N, Picao RC, Adams-Sapper S, Riley LW, Moreira BM. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 698-701.

12. Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1* upstream *bla*OXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect* 2012; 141: 330-3.
13. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 24-38.
14. Pagano M, Rozales FP, Bertolini D, Rocha L, Sampaio JLM, Barth AL, et al. Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the *bla*OXA-72 gene in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111: 597-8.
15. Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36: 860-2.
16. Schimith KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, do Nascimento AJ, et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control* 2010; 38: 308-14.

<b>Isolate</b>	<b>Location</b>	<b>REP-PCR</b>	<b>ST<sup>a</sup></b>	<b>CC<sup>b</sup></b>	<b>Int</b>
15POA	Rio Grande do Sul	A	730	79	<i>Int2</i>
16POA	Rio Grande do Sul	A	730	79	<i>Int2</i>
6SP	São Paulo	A	79	79	<i>Int2</i>
7SP	São Paulo	A	79	79	<i>Int2</i>
1PR	Paraná	B	180	15	<i>Int1</i>
7PR	Paraná	B	180	15	<i>Int1</i>
8PR	Paraná	B	180	15	<i>Int1</i>
9PR	Paraná	B	180	15	<i>Int1</i>
15PR	Paraná	B	180	15	<i>Int1</i>
17PR	Paraná	B	891	Singleton	<i>Int1</i>
5PR	Paraná	C	890	15	<i>Int1</i>

<sup>a</sup> Sequence type by Institute Pasteur MLST scheme.

<sup>b</sup> CC: MLST clonal complex defined by Institute Pasteur.

**4.5 MANUSCRITO V- Comparative analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* population structure in Southern Brazil: from the first outbreak (2007-2008) to the endemic rates (2013-1014)**

Manuscrito a ser submetido na revista *Infeccion Control and Hospital Epidemiology*





**Comparative analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* population structure in Southern Brazil: from the first outbreak (2007-2008) to the endemic rates (2013-2014)**

Mariana Pagano, MsC<sup>1,2</sup>, Luciana S Nunes, PhD<sup>2</sup>, Marina Niada<sup>2</sup>, Andreza F Martins, PhD<sup>2,3</sup>, Afonso Luís Barth, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author: Mariana Pagano, MSc

Address: Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil

Email address: mari.pag@hotmail.com

Phone: (55)(51)33598607

Running title: *A. baumannii* population structure in Southern Brazil

Word count: 1176

## Abstract

**Objective:** To characterize the population structure of *Acinetobacter baumannii* isolates from Porto Alegre, Southern Brazil, in two distinct periods: during the first carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) outbreak (2007-2008) and five years later when the CRAB reached endemic levels (2013-2014).

**Methods:** Multilocus sequence typing (MLST) according to Institute Pasteur was performed in a collection of 49 CRAB isolates.

**Results:** eBURST showed the presence of the epidemic clonal complexes CC15, CC32, CC79, CC216, CC221 and CC464 in the first period (2007-2008) and CC1, CC2, CC15, CC79 and CC162 during the endemic period (2013-2014). Molecular analysis by MLST identified 13 new sequence types (STs): ST883, ST884, ST885, ST886, ST887, ST888, ST889, ST892, ST899, ST902, ST903, ST904 and ST905.

**Conclusion:** We established that the high-risk clonal complexes CC15 and CC79 were not only the main CCs related to the first CRAB outbreak, but also that these CCs persisted from 2007 to 2014 in Porto Alegre city. Moreover, the international clones CC1 and CC2 were observed for the first time in the 2013-2014 period, alerting to the emergence of these clones in Southern Brazil.

## Introduction

*Acinetobacter baumannii* is an important opportunistic pathogen that has caused severe nosocomial infections worldwide, especially in intensive care unit (ICU) patients <sup>1</sup>. During the last two decades, *Acinetobacter baumannii* has become a pathogen of increased clinical importance due to its remarkable ability to cause outbreaks of infections and to acquire resistance to almost all currently used antibiotics, including the carbapenems <sup>2</sup>. In early 2007, several hospitals in Porto Alegre, the capital of the southernmost Brazilian state, presented carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) outbreaks, as did other Brazilian cities <sup>3</sup>. After these first outbreaks, most Brazilian institutions remained with endemic rates of CRAB, including most hospitals of Porto Alegre <sup>4</sup>. The evaluation of the clonal diversity of *A. baumannii* isolates is very important in terms of understanding the epidemiology of outbreaks. Multilocus sequence typing (MLST) is a reliable tool to provide consistent data on population structure of *A. baumannii* isolates, mainly due to the fact that the results are comparable among different regions <sup>2,5</sup>. In the present study, we evaluated by MLST the evolution and clonal diversity of 49 non-duplicate *A. baumannii* strains isolated in Porto Alegre, Southern Brazil from two different periods: during the first CRAB outbreak in the city (2007-2008) and five years later (2013-2014).

## Material and Methods

During the first CRAB outbreak in Porto Alegre (between 2007 and 2008), 239 carbapenem-resistant isolates, from five hospitals, were typed by PFGE and separated in distinct clonal groups <sup>4</sup>. From these 239 isolates, we selected 31 CRAB strains representing different clonal types and different institutions for the present study.

Moreover, in order to compare the clonal distribution of *A. baumannii* isolates in two different periods in Porto Alegre city, we selected from a total of 554 CRAB isolates,

18 different *A. baumannii* clonal types, determined by REP-PCR <sup>6</sup>, obtained between 2013 and 2014 from six hospitals.

Only one isolate per patient, of both periods, was included in this study. Identification as *Acinetobacter* spp. was determined by Vitek-2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Species identification was performed using *gyrB* multiplex PCR <sup>7</sup>. Susceptibility to meropenem and imipenem was performed by the disk diffusion method on Mueller–Hinton agar (bioMérieux) and interpreted according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>8</sup>.

The isolates were screened for oxacilinases genes (*blaOXA-23*, *blaOXA-24/40*, *blaOXA-51*, *blaOXA-58*, and *blaOXA-143*) by multiplex PCR <sup>9</sup>. To determine whether *ISAbal* was present upstream of *blaOXA-23* gene, PCR using *ISAbal* forward/OXA-23 reverse primers (*ISAbal*F/ OXA-23R PCR) was performed <sup>10</sup>. Class 1 and 2 integrons were detected by PCR using primers for the integrase gene <sup>11</sup>. The population structure of CRAB in the two periods of study (2007-2008 and 2013-2014) was evaluated by MLST according to Institute Pasteur scheme (<http://www.pasteur.fr/mlst>) by DNA sequencing of internal regions of 7 housekeeping genes (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, and *rpoB*). Analyses of the allele sequences and sequence type (ST) were performed through the *A. baumannii* MLST Web site (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). The relationship among the new and existing STs was surveyed by the use of the eBURST program (<http://eburst.mlst.net/>).

## Results

All 49 strains were identified as *A. baumannii* and proved to be resistant to carbapenems. Among these strains, 48 (98%) harbored a *blaOXA-23* gene and one (2%) harbored the *blaOXA-24* gene. *ISAbal/blaOXA-23* was present in 44 out of 49 strains. Class 1 and 2 integrons were found in 5 (10.2%) and 32 (65.3%) of strains, respectively. Both integrons were found simultaneously in 8 (16.3%) CRAB (Table). MLST performed in the 49 isolates representing different clones allowed us to identify 22 sequence types (STs) – (Table). Noteworthy, a total of 13 new STs were

identified and deposited in the MLST database (ST883, ST884, ST885, ST886, ST887, ST888, ST889, ST892, ST899, ST902, ST903, ST904 and ST905) (Figure 1). In the first period of the study the ST79 and ST180 were the most prevalent, while between 2013 and 2014 it was observed a more heterogeneous clonal profile (Figure 2). Analysis by eBURST showed the presence of 8 clonal-complexes: CC1, CC2, CC15, CC32, CC79, CC162, CC221 and CC464. The temporal analysis of *A. baumannii* clones demonstrated the continuous presence of ST79 (CC79) and ST180 (CC15) in both periods of the study. Although CC1 and CC2 were not observed during the first CRAB outbreak period (2007-2008), these CCs could be found in the endemic period (2013-2014).

## **Discussion**

Clonal lineages have long been associated with multiple drug resistance, and this feature might confer a selective advantage for their expansion<sup>2</sup>. In the present study we aimed to compare and describe the clonal diversity of CRAB isolates from Porto Alegre city in two different periods: during the first CRAB outbreak (2007-2008) and five years later during the endemic period (2013-2014). Previous studies reported the dissemination of two major clusters, clonal complexes (CC) 15 and 79, of multidrug-resistant *A. baumannii* in different Brazilian states harbouring *bla*OXA-23 gene<sup>12, 13</sup>. In this study, it was possible to observe the predominance of these clonal complexes during the two periods of the study, which demonstrates not only the capacity of these highly successful clones to play a leading role in the increasing global occurrence of *A. baumannii* infections, but also to remain in the hospital settings for long periods.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

**Financial support:** CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, Brazil. FIPE/HCPA (Research and Events Support Fund at Hospital de Clínicas de Porto Alegre). A.L.B is a research fellow from the CNPq, Ministry of Science and Technology, Brazil (458489/2014-0).

**Potential conflict of interest:** None

**Authorship and manuscript preparation:** A.L.B and A. F. M. conceived the study. M.P., L.S.N and M.N collected data and performed the experiments. All authors analysed the data. M. P. wrote the first version of the manuscript. All contributed to the final version.

**REFERENCES**

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 939-951.
2. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, et al. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 2012; 15: 237-247.
3. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 2009; 37: 474-476.
4. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, et al. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 2011; 40: 108-112.
5. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrobl Chemother* 2010; 65: 233-238.
6. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-643.
7. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, et al. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4592-4594.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: CLSI document M100-S24; 2014.
9. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 305-305.
10. Turton JF, Ward ME, Woodford N. et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 258: 72-77.
11. Koeleman JGM, Stoof J, Van der Bijl MW, et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 8-13.
12. Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, 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: 2545-2547.
13. Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, et al. 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: 468-472.
14. Martins N, Picao RC, Adams-Sapper S, et al. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international



- clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 698-701.
15. Pagano M, Martins AF, Machado AB et al. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1* upstream *bla*OXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect* 2012; 141: 1-4.
  16. Ramírez MS, Piñeiro S, Centrón D, et al. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 699-706.
  17. Fonseca EL, Freitas FD, Scheidegger EMD, et al. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 95-96.
  18. Diancourt L, Passet V, Nemec A, et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5: e10034.
  19. Provasi Cardoso J, Cayo R, Girardello R, et al. Diversity of mechanisms conferring resistance to beta-lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85: 90-97.
  20. Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, et al. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: reflection of a global expansion. *Infect Genet Evol* 2013; 20: 378-380.

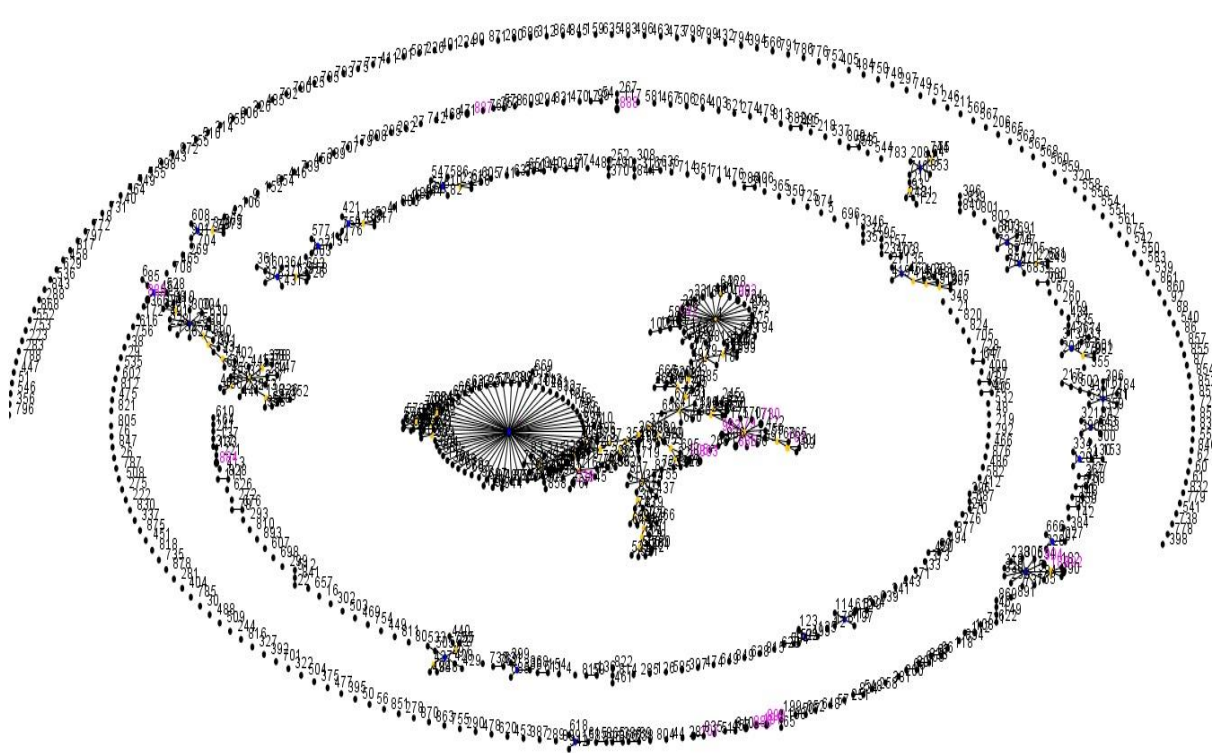


Figure 1. Clustering of 905 *A. baumannii* STs by eBurst (<http://eburst.mlst.net/>), with MLST profiles representing the isolates from the Institute Pasteur database (data accessed on 05 August 2016). STs determined for strains of the present study are in pink.

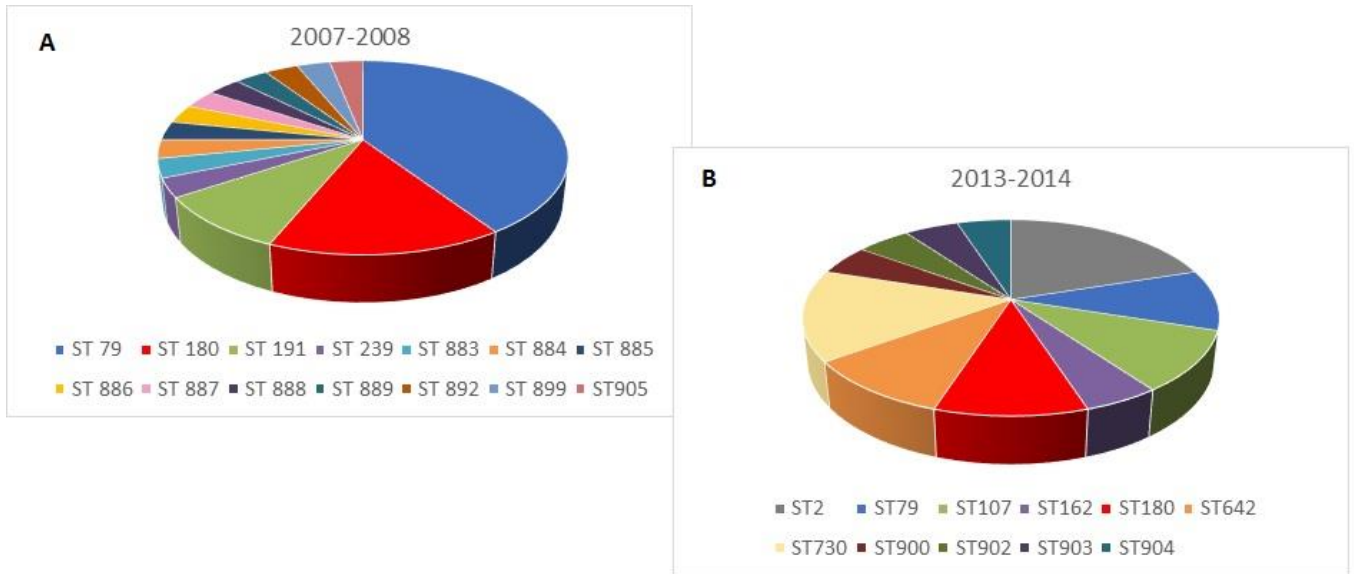


Figure 2. Prevalence of CRAB STs in the city of Porto Alegre, Southern Brazil. A) Period of 2007-2008 and B) Period of 2013-2014.

Table. Characteristics of the 49 carbapenem-resistant *A. baumannii* of two distinct periods (2007-2008 and 2013-2014) in the city of Porto Alegre

<b>ID</b>	<b>Hospital</b>	<b>Year</b>	<b>Integrase</b>	<b>blaOXA</b>	<b>ISAbal/OXA-23</b>	<b>ST</b>	<b>CC</b>
1-114	1	2007	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
1-118	1	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
4-69	4	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
4-92	4	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
4-30	4	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
4-28	4	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
2-439	2	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
3-504	3	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
4-181	4	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
5-75	5	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
5-25	5	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	-	79	79
5-98	5	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	-	79	79
2-69	2	2007	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
5-19	5	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
2-400	2	2008	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
3-657	3	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
5-61	5	2008	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
2-40	2	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	191	-
4-51	4	2007	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	191	-
4-115	4	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	191	-
5-46	5	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	-	239	216
1-143	1	2008	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	883	32
1-135	1	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	884	221
2-664	2	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	885	79
3-409	3	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	886	-
2-383	2	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	887	-
3-461	3	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	888	-
3-616	3	2008	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	889	464
3-471	3	2008	<i>Int1/Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	892	15
3-519	3	2008	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	899	-
1-122	1	2007	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	905	32
3-353	3	2013	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
2-369	2	2013	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	107	-
1-57	1	2013	<i>Int1</i>	<i>blaOXA-23</i>	-	180	15
3-322	3	2013		<i>blaOXA-23</i>	+	180	15
2-544	2	2013		<i>blaOXA-23</i>	+	642	1
3-317	3	2013	<i>Int1</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	642	1
6-15	6	2013	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-24</i>	-	730	79
1-50	1	2013	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	730	79
2-393	2	2013	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	903	79
1-80	1	2013		<i>blaOXA-23</i>	+	904	15

---

<b>2-691</b>	2	2014	<i>Int1</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	2	2
<b>2-588</b>	2	2014	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	2	2
<b>2-621</b>	2	2014	<i>Int1</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	2	2
<b>2-652</b>	2	2014	<i>Int1</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	2	2
<b>2-639</b>	2	2014	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	79	79
<b>3-605</b>	2	2014	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	107	-
<b>2-695</b>	2	2014	<i>Int2</i>	<i>blaOXA-23</i>	+	162	162
<b>2-692</b>	2	2014		<i>blaOXA-23</i>	-	902	1

---



## 5. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foram avaliados 524 isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de seis instituições de saúde da cidade de Porto Alegre. Quanto ao perfil de sensibilidade, foi observada uma alta prevalência de isolados não sensíveis aos carbapenêmicos (435/83%). Este dado corrobora o que foi demonstrado pelo último boletim da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que reportou níveis de 77,8% de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. na região Sul do país (ANVISA, 2015).

Do total de isolados avaliados, 487 (92,9%) foram identificados como *A. baumannii* e dentre estes, 88,1% apresentaram a carbapenemase OXA-23, demonstrando que este é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos envolvido em *A. baumannii*, como já descrito em diversos estudos do Brasil e do mundo (Medeiros et al. 2013; Mugnier et al. 2010). Além disso, cabe ressaltar que foram evidenciados dois isolados de *A. nosocomialis* contendo *bla*OXA-23, fato que demonstra a capacidade de disseminação interespecíes deste gene.

A partir da investigação de outras carbapenemases envolvidas na resistência em *Acinetobacter*, identificamos e caracterizamos por MLST os primeiros isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-72 do Sul do país. Outros estudos já haviam descrito esse gene em isolados da região Nordeste e Sudeste do Brasil (de Sa Cavalcanti et al. 2013; Antonio et al. 2011; Werneck et al. 2011), entretanto nenhum havia caracterizado por MLST as *sequence types* envolvidas na disseminação deste gene.

A tipagem molecular por MLST demonstrou que os isolados produtores de *bla*OXA-72 de nosso estudo pertenciam a ST730. Essa ST foi descrita recentemente em isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 no Brasil, entretanto nunca em isolados contendo *bla*OXA-72 (Vasconcelos et al. 2015). A ST730 está inserida no complexo clonal CC79. Chagas e colaboradores descreveram a disseminação deste complexo clonal relacionado a isolados de *A. baumannii* contendo o gene *bla*OXA-23 em diversos estados do país (Chagas et al. 2014).

No presente estudo, também foram caracterizados por MLST isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-72 provenientes de outros dois estados do Brasil (Paraná e São Paulo) em conjunto com outro projeto de pesquisa de nosso grupo. Com isso, foi possível determinar as STs envolvidas na disseminação de *bla*<sub>OXA-72</sub> no Sul e Sudeste do país. Os isolados analisados demonstraram pertencer a cinco diferentes STs: ST79, ST180, ST730, além das novas ST890 e ST891. Através de análise dos dados com o *software* eBURST, observamos que estas STs estão inseridas em importantes complexos clonais: CC15 (ST180 e ST890), CC79 (ST79 e ST730), além da ST891 que foi classificada como *singleton*. A partir destes dados foi possível fazer a primeira descrição de produtores de OXA-72 associados ao CC15. Este complexo clonal está disseminado mundialmente, sendo associado a isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diversos continentes, inclusive em isolados do Brasil, entretanto nunca antes relacionado à disseminação de *bla*<sub>OXA-72</sub> (Karah et al. 2012; Chagas et al. 2014).

Apesar da produção de oxacilinas ser o principal mecanismo envolvido na resistência em *Acinetobacter*, é necessário estar atento a outras carbapenemases que estão emergindo, como por exemplo, *bla*<sub>NDM</sub>, a mais recente metalo-beta-lactamase descrita, principalmente em isolados da família *Enterobacteriaceae* (Dordet et al. 2014). Em 2014, Pillionetto e colaboradores descreveram o primeiro caso de *A. baumannii* contendo o gene *bla*<sub>NDM</sub> no Brasil (Pillionetto et al. 2014). Posteriormente, foi identificado em nosso banco de isolados, o primeiro *Acinetobacter* não-*baumannii* (*A. pittii*) contendo o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> no país (Pagano et al. 2015). Análise por MLST demonstrou que o isolado pertencia a ST119, descrita apenas em isolados de *A. pittii* no Japão. A análise do contexto genético de *bla*<sub>NDM-1</sub> demonstrou que o gene está associado ao elemento *ISAbal25* como já demonstrado em outros estudos em isolados contendo *bla*<sub>NDM-1</sub> (Poirel et al. 2012).

Através da técnica de MLST, realizamos a descrição dos clones de *A. baumannii* circulantes na cidade de Porto Alegre em dois períodos distintos: durante o primeiro surto de CRAB de Porto Alegre (2007-2008), e cinco anos após (2013-2014), quando *A. baumannii* apresentava níveis endêmicos em todas as instituições de saúde da cidade. A partir da análise dos resultados com o *software* eBURST foi



possível fazer a descrição e o depósito de 13 novas STs no banco de dados do Instituto Pasteur: ST883 (CC32), ST884 (CC221), ST885 (CC79), ST886, ST887, ST888, ST889 (CC464), ST892 (CC15), ST899, ST902 (CC1), ST903 (CC79), ST904 (CC15) e ST905 (CC32).

A avaliação da dinâmica populacional de *A. baumannii* nos dois períodos avaliados demonstrou a persistência dos complexos clonais CC15 e CC79 desde o período do primeiro surto de CRAB no ano de 2007 até o ano de 2014. Além disso, foi possível observar durante os anos de 2007 e 2008 uma prevalência de isolados pertencentes aos CC15 e CC79, fato que nos permite inferir que o primeiro surto de CRAB produtor de OXA-23 da cidade de Porto Alegre foi relacionado a disseminação destes complexos clonais.

Diversos trabalhos já demonstraram que isolados de *A. baumannii* pertencentes ao CC15 apresentam um grande sucesso evolucionário, além de estarem quase que unicamente relacionados a perfis de multirresistência, o que facilitaria sua rápida expansão clonal ao longo dos anos (Diancourt et al. 2010; Karah et al. 2012). CC15 tem sido descrito em diversos países da Europa como Itália, Espanha, Grécia e Turquia (Karah et al. 2012). No Brasil, Chagas e colaboradores demonstraram a disseminação deste complexo clonal em diversos estados como Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Rio Grande do Norte (Chagas et al. 2014).

Diferentemente do complexo clonal CC15, que está mundialmente disseminado, CC79 encontra-se restrito a países da América Latina como Brasil e Argentina (Stietz et al., 2013; Chagas et al. 2014). Os resultados descritos em nosso estudo corroboram o que foi publicado por Stietz e colaboradores, que demonstraram a permanência do CC79 durante os anos de 1992 à 2009 em isolados endêmicos e epidêmicos de *A. baumannii* provenientes de hospitais de Buenos Aires (Stietz et al. 2013). Além disso, nossos resultados demonstraram que todos os isolados pertencentes ao CC79 apresentavam integrons de classe 2. Esta correlação entre a prevalência de CC79 na América Latina e os altos níveis de integrons de classe 2 no continente já foi reportada por Martins e colaboradores (Martins et al. 2015).

O CC2 (*International clone II*) é maior e mais disseminado complexo clonal descrito até o momento (Karah et al. 2012). Este CC já foi descrito em 34 países espalhados por diversos continentes. Em nosso estudo, quatro isolados de *A. baumannii*, coletados em 2014, pertenciam a esse CC apresentando o gene *blaOXA-23* associado a *ISAba1*. É importante salientar que além de estar associado a isolados produtores de oxacilinases, CC2 também foi relacionado à um clone de *A. baumannii* produtor de KPC identificado em Porto Rico (Martinez et al. 2016). Com isso, a capacidade deste complexo clonal de carrear uma variedade de genes de resistência, além de permanecer por longos períodos no ambiente hospitalar, deve alertar para a possível disseminação de CC2 na América do Sul.

Por fim, através dos dados gerados neste estudo, foi possível fazer uma análise da dinâmica populacional de isolados de *A. baumannii* multirresistentes circulantes na cidade de Porto Alegre, comparando com clones circulantes no mundo todo. Dessa forma, conseguimos contextualizar a produção de carbapenemases como OXA-72 e OXA-23 com clones bem sucedidos de *A. baumannii* circulantes no Brasil e no mundo. A descrição de importantes complexos clonais como CC15 e CC79 associados a mecanismos emergentes como a produção de OXA-72, ressalta a importância deste trabalho na avaliação da disseminação clonal destas cepas, permitindo sua contextualização na epidemiologia global de isolados de *A. baumannii* multirresistentes.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusões gerais deste trabalho podemos destacar:

1. A elevada prevalência de isolados resistentes aos carbapenêmicos.
2. A produção da oxacilinase OXA-23 foi o principal mecanismo associado à resistência aos carbapenêmicos nos isolados de *A. baumannii* avaliados.
3. O primeiro relato do gene *bla*OXA-72 no Sul do país, associado a ST730.
4. O primeiro relato de *bla*NDM-1 em um isolado de *Acinetobacter pittii* no país.
5. A caracterização do ambiente genético de *bla*NDM-1 a qual demonstrou que o gene está inserido no cromossomo bacteriano e a sequência de inserção *ISAbal25* está localizada *upstream* ao gene.
6. O isolado de *Acinetobacter pittii* pertencente a ST719.
7. A descrição de importantes complexos clonais como CC15 e CC79 associados a isolados produtores de OXA-72 em diferentes estados do país.
8. Descrição de 13 novas STs relacionadas a isolados de CRAB: ST883 (CC32), ST884 (CC221), ST885 (CC79), ST886, ST887, ST888, ST889 (CC464), ST892 (CC15), ST899, ST902 (CC1), ST903 (CC79), ST904 (CC15) e ST905 (CC32).
9. A descrição dos complexos clonais CC15 e CC79 associados ao primeiro surto de CRAB produtor de OXA-23 da cidade de Porto Alegre.
10. O surgimento dos complexos clonais CC1 e CC2 em isolados de *A. baumannii* entre os anos de 2013 e 2014.



## 7. FIGURAS

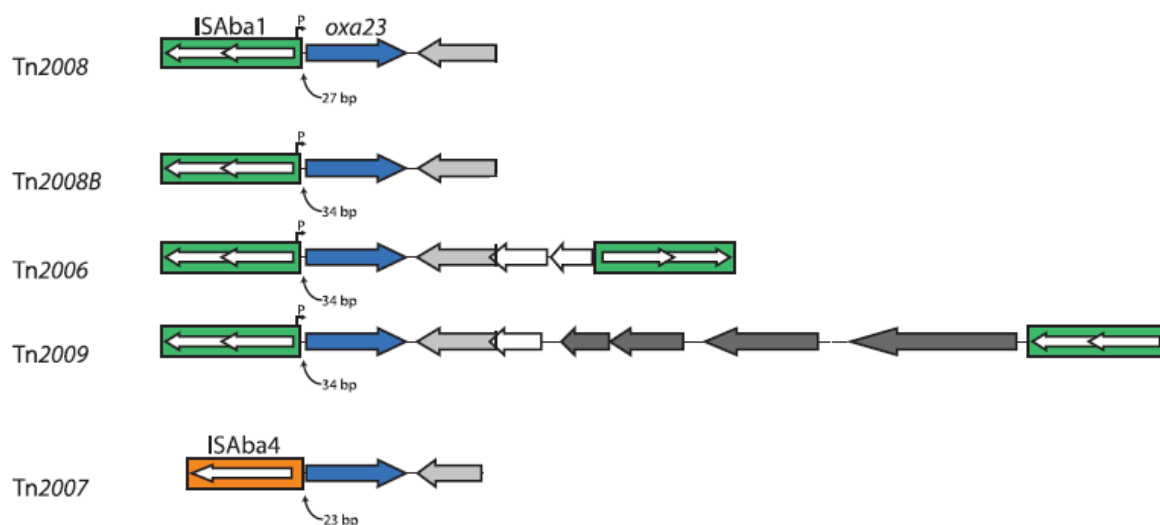


Figura 1. Representação esquemática dos cinco transposons relacionados ao gene *blaOXA-23*, que está demonstrado nas setas azuis. Genes com função ainda desconhecida estão representados nas setas brancas, enquanto os genes que são exclusivos do Tn2009 estão em cinza escuro. A seta curvada indica a distância em pares de bases (bp) entre a sequência de inserção e o códon de iniciação do gene *blaOXA-23*\*

\* Representação adaptada de Nigro & Hall (Nigro and Hall 2016).

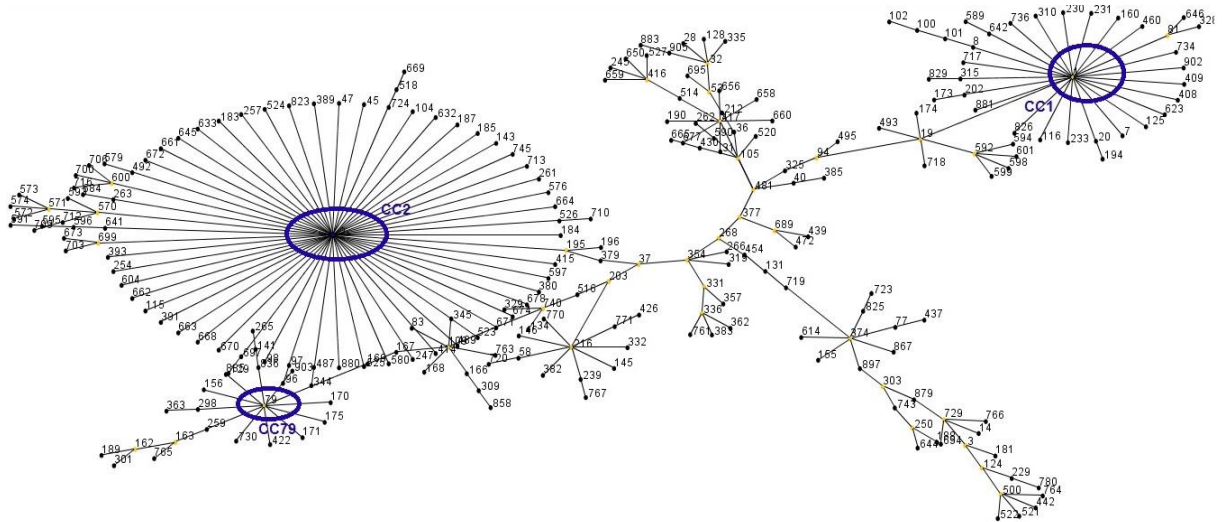


Figura 2. Representação dos complexos clonais CC1, CC2 e CC79 de *A. baumannii*.

Circulado em azul, no centro de cada CC está a ST que deu origem ao complexo.

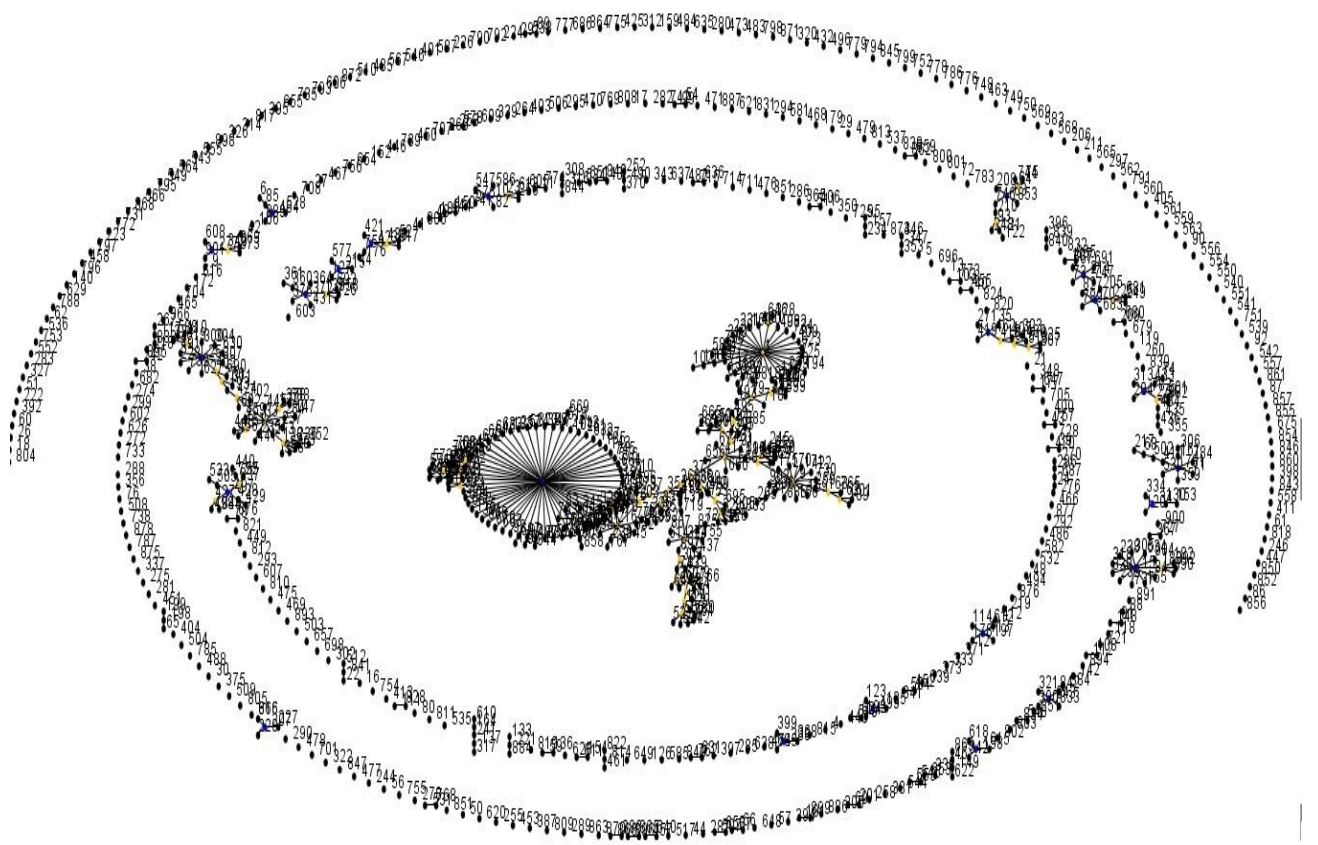


Figura 3. Árvore filogenética das 905 diferentes STs depositadas até o momento no banco de dados do Instituto Pasteur (eBURST realizado dia 05/08/2016).





## 8. TABELA

Subgrupo filogenético	Componentes do grupo	Nº de enzimas no grupo	Localização
OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239	19	Plasmideo/Cromossomo
OXA-40-like	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207	7	Plasmideo/Cromossomo
OXA-51-like	OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254	95	Plasmideo/Cromossomo
OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164	4	Plasmideo/Cromossomo
OXA-143-like	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255	5	Plasmideo
OXA-235-like	OXA-235–OXA-237, OXA-278	7	Plasmideo/Cromossomo

Tabela 1. Subgrupos de OXA-carbapenemases identificadas em *A. baumannii*\*

\*Adaptado de Evans &amp; Amies 2014



## 9. REFERÊNCIAS

Ambler, R. P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289 (1036):321-331.

Antonio, C. S., P. R. Neves, M. Medeiros, E. M. Mamizuka, M. R. Elmor de Araujo, and N. Lincopan. 2011. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *blaOXA-143* gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (3): 1322-1323.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12, de 31 de dezembro de 2015. Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva (2014).

Bartual, S. G., H. Seifert, C. Hippler, M. A. Luzon, H. Wisplinghoff, and F. Rodriguez-Valera. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43 (9):4382-4390.

Bennett, P. M. 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* 266:71-113.

Berg, D., and M. Howe. 1989. *Mobile DNA*. Washington DC: American Society for Microbiology.

Bonnet, R., H. Marchandin, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, E. Jumas-Bilak, and J. Sirot. 2002. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (6):2004-2006.

Bonnin, R. A., P. Nordmann, and L. Poirel. 2013. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11 (6):571-583.

Bonnin, R. A., P. Nordmann, A. Potron, H. Lecuyer, J. R. Zahar, and L. Poirel. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (1):349-354.

Bonnin, R. A., L. Poirel, T. Naas, M. Pirs, K. Seme, J. Schrenzel, and P. Nordmann. 2012a. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18 (9):362-365.

Bonnin, R. A., L. Poirel, and P. Nordmann. 2012b. AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 67 (1):234-236.

Bou, G., A. Oliver, and J. Martinez-Beltran. 2000. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (6):1556-1561.

Bratu, S., D. Landman, D. A. Martin, C. Georgescu, and J. Quale. 2008. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-Like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York city. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (9):2999-3005.

Brown, S., and S. Amyes. 2006. OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 57 (1):1-3.

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

Bush, K., and G. A. Jacoby. 2010. Updated Functional Classification of beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (3):969-976.

Camargo, C. H., M. R. Tiba, M. R. Saes, F. M. Vasconcellos, L. F. Santos, E. C. Romero, and O. Garcia Dde. 2016. Population Structure Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Brazil Reveals Predominance of Clonal Complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother* 60 (4):2545-2547.

Cambray, G., A. M. Guerout, and D. Mazel. 2010. Integrons. *Annu Rev Genet* 44:141-166.

Carretto, E., D. Barbarini, L. Dijkshoorn, T. J. van der Reijden, S. Brisse, V. Passet, and C. Farina. 2011. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. *Infect Genet Evol* 11 (6):1319-1326.

Carvalho, K. R., A. P. Carvalho-Assef, G. Peirano, L. C. Santos, M. J. Pereira, and M. D. Asensi. 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34 (1):25-28.

Chagas, T. P., K. R. Carvalho, I. C. de Oliveira Santos, A. P. Carvalho-Assef, and M. D. Asensi. 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 79 (4):468-472.

Cooper, J. E., and E. J. Feil. 2004. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* 12 (8):373-377.

Cornaglia, G., H. Giamarellou, and G. M. Rossolini. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 11 (5):381-393.

Corvec, S., N. Caroff, E. Espaze, C. Giraudeau, H. Drugeon, and A. Reynaud. 2003. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 52 (4):629-635.

Corvec, S., L. Poirel, T. Naas, H. Drugeon, and P. Nordmann. 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*(OXA-23) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (4):1530-1533.

Cosgaya, C., M. Marí-Almirall, A. Van Assche, D. Fernández-Orth, N. Mosqueda, M. Telli, G. Huys, P.G. Higgins, H. Seifert, B. Lievens, I. Roca, J. Vila. 2016. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a new member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol*

Dalla-Costa, L. M., J. M. Coelho, H. Souza, M. E. S. Castro, C. J. N. Stier, K. L. Bragagnolo, A. Rea-Neto, S. R. Penteadó, D. M. Livermore, and N. Woodford. 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 41 (7):3403-3406.

de Sa Cavalcanti, F. L., A. C. Almeida, M. A. Vilela, M. A. de Moraes Junior, M. M. de Moraes, and T. C. Leal-Balbino. 2013. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? *Diagn Microbiol Infect Dis* 77 (3):250-251.

de Souza Gusatti, C., L. M. Bertholdo, L. M. Otton, D. P. Marchetti, A. E. Ferreira, and G. Corcao. 2012. First occurrence of *bla* OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. *Braz J Microbiol* 43 (1):243-246.

Diancourt, L., V. Passet, A. Nemec, L. Dijkshoorn, and S. Brisse. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5 (4):e10034.

Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiol* 5 (12):939-951.

Dortet L, L. Poirel, and P. Nordmann. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014 (2014): 1-12.

Durante-Mangoni, E., and R. Zarrilli. 2011. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 6 (4):407-422.

Evans, B. A., and S. G. Amyes. 2014. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27 (2):241-263.

Figueiredo, D. Q., K. R. Santos, E. M. Pereira, R. P. Schuenck, C. R. Mendonça-Souza, L. M. Teixeira, and S. S. Mondino. 2011. First report of the *bla*OXA-58 gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (3):368-370.

Fluit, A. C., and F. J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10 (4):272-288.

Fonseca, E. L., F. D. Freitas, E. M. D. Scheidegger, T. Jacinto, and A. C. P. Vicente. 2011. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. *Int J Antimicrob Agents* 38 (1):95-96.

Fournier, P. E., D. Vallenet, V. Barbe, S. Audic, H. Ogata, L. Poirel, H. Richet, C. Robert, S. Mangenot, C. Abergel, P. Nordmann, J. Weissenbach, D. Raoult, and J. M. Claverie. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2 (1):e7.

Gales, A. C., M. C. B. Tognim, A. O. Reis, R. N. Jones, and H. S. Sader. 2003. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45 (1):77-79.

Gerner-Smidt, P., I. Tjernberg, and J. Ursing. 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2):277-282.

Giamarellou, H., A. Antoniadou, and K. Kanellakopoulou. 2008. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 32 (2):106-119.

Gillings, M. R. 2014. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* 78 (2), 257-277.

Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella, and R. Zemelman. 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 161 (1):125-128.

Gordon, N. C., and D. W. Wareham. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 35 (3):219-226.

Grosso G., K. R. Carvalho, S. Quinteira, A. Ramos, A. P. Carvalho-Assef, M. D. Asensi and L. Peixe. 2011. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother* 6 (1):62-65.



Hall, R. M., D. E. Brookes, and H. W. Stokes. 1991. Site-specific insertion of genes into integrons - role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* 5 (8):1941-1959.

Hall, R. M., and C. M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons - capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15 (4):593-600.

Hamouda, A., B. A. Evans, K. J. Towner, and S. G. Amyes. 2010. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*(OXA-51-like) genes. *J Clin Microbiol* 48 (7):2476-2483.

Heritier, C., L. Poirel, P. E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, and P. Nordmann. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (10):4174-4179.

Heritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann. 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 12 (2):123-130.

Higgins, P. G., F. J. Perez-Llarena, E. Zander, A. Fernandez, G. Bou, and H. Seifert. 2013. OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (5):2121-2126.

Higgins, P. G., L. Poirel, M. Lehmann, P. Nordmann, and H. Seifert. 2009. OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D beta-Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (12):5035-5038.

Howard, A., M. O'Donoghue, A. Feeney, and R.D. Sleator. 2012. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3 (3): 243-250.

Kaitany KC, N.V. Klinger, C.M. June, M.E. Ramey, R.A. Bonomo, R.A. Powers, D.A. Leonard. 2013. Structures of the class D carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins and aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (10):4848–4855.

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

Karthikeyan, K., M. A. Thirunarayan, and P. Krishnan. 2010. Coexistence of *bla*OXA-23 with *bla*NDM-1 and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 65(10):2253-2254.

Kempf, M., and J. M. Rolain. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39 (2):105-114.

Krizova, L., L. Dijkshoorn, and A. Nemeč. 2011. Diversity and Evolution of AbaR Genomic Resistance Islands in *Acinetobacter baumannii* Strains of European Clone I. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (7):3201-3206.

La, M. V., R. Jureen, R.T. Lin, and J.W. Teo. 2014. Unusual detection of an *Acinetobacter* class D carbapenemase gene, *bla*OXA-23, in a clinical *Escherichia coli* isolate. *J Clin Microbiol* 52 (10): 3822-3823.

Lee, H. Y., R. C. Chang, L. H. Su, S. Y. Liu, S. R. Wu, C. H. Chuang, C. L. Chen, and C. H. Chiu. 2012a. Wide spread of Tn2006 in an AbaR4-type resistance island

among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 40 (2):163-167.

Lee, Y. T., L. Y. Huang, T. L. Chen, L. K. Siu, C. P. Fung, W. L. Cho, K. W. Yu, and C. Y. Liu. 2009a. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. *J Microbiol Immunol Infect* 42 (3):210-219.

Lee, Y. T., S. C. Kuo, M. C. Chiang, S. P. Yang, C. P. Chen, T. L. Chen, and C. P. Fung. 2012b. 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* 56 (2):1124-1127.

Lee, Y. T., J. F. Turton, T. L. Chen, R. C. C. Wu, W. C. Chang, C. P. Fung, C. P. Chen, W. L. Cho, L. Y. Huang, and L. K. Siu. 2009b. First Identification of *bla*(OXA-51-like) in Non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J Chemother* 21 (5):514-520.

Levy, S. B., and B. Marshall. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10 (12):S122-S129.

Lewin, B. 2004. Transposons. In *Genes VIII*, edited by P. P. Hall. Upper Saddle River, NJ, 467-480.

Livermore, D. M., and N. Woodford. 2006. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology* 14 (9):413-420.

Mahillon, J., and M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (3):725-774.

Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (6):3140-3145.

Martinez T, I. Martinez, G. J. Vazquez, E. E. Aquino, I. E. Robledo. 2016. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J Med Microbiol* doi: 10.1099/jmm.0.000289 [Epub ahead of print].

Martins, A. F., R. Kuchenbecker, T. Sukiennik, R. Boff, K. C. Reiter, L. Lutz, A. B. Machado, and A. L. Barth. 2009. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 37 (5):474-476.

Martins, A. F., R. S. Kuchenbecker, K. O. Pilger, M. Pagano, A. L. Barth, and t. C.-P. S. T. Force. 2011. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 40(2):108-112.

Martins, N., R. C. Picao, S. Adams-Sapper, L. W. Riley, and B. M. Moreira. 2015. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 59 (1):698-701.

Mazel, D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4 (8):608-620.

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

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

Moubareck, C., S. Bremont, M. C. Conroy, P. Courvalin, and T. Lambert. 2009. GES-11, a Novel Integron-Associated GES Variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (8):3579-3581.

Mugnier, P. D., L. Poirel, T. Naas, and P. Nordmann. 2010. Worldwide Dissemination of the *bla*(OXA-23) Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 16 (1):35-40.

Mugnier, P. D., L. Poirel, and P. Nordmann. 2009. Functional Analysis of Insertion Sequence ISAbal, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 191 (7):2414-2418.

Munoz-Price, L. S., and R. A. Weinstein. 2008. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 358 (12):1271-1281.

Nigro, S., and R. M. Hall. 2015. Distribution of the *bla*OXA-23-containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Antimicrob Chemother* 70(8):2409-2411.

Nigro, S. J., and R. M. Hall. 2016. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa-23 carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother* 71 (5):1135-1147.

Nordmann, P., and L. Poirel. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8 (6):321-331.

Oh, J. Y., K. S. Kim, Y. W. Jeong, J. W. Cho, J. C. Park, and J. C. Lee. 2002. Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. *APMIS* 110 (3):247-252.

Pagano, M., A. F. Martins, A. B. Machado, J. Barin, and A. L. Barth. 2012. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*AbaI* upstream *bla*OXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect* 141(2):330-333.

Pagano, M., L. Poirel, A. F. Martins, F. P. Rozales, A. P. Zavascki, A. L. Barth, and P. Nordmann. 2015. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 45 (4):444-445.

Paterson, D. L. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 43:S43-S48.

Paton, R., R. S. Miles, J. Hood, and S. G. Amyes. 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2 (2):81-87.

Peleg, A. Y., H. Seifert, and D. L. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21 (3):538-582.

Perez-Losada, M., P. Cabezas, E. Castro-Nallar, and K. A. Crandall. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 16:38-53.

Pillonetto, M., L. Arend, E. C. Vespero, M. Pelisson, T. P. Chagas, A. P. Carvalho-Assef, and M. D. Asensi. 2014. The first report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58 (12): 7592-7594.

Poirel, L., R. A. Bonnin, A. Boulanger, J. Schrenzel, M. Kaase, and P. Nordmann. 2012. Tn125-related acquisition of *bla*NDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (2):1087-1089.

Poirel, L., S. Figueiredo, V. Cattoir, A. Carattoli, and P. Nordmann. 2008. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (4):1252-1256.

Poirel, L., S. Marque, C. Heritier, C. Segonds, G. Chabanon, and P. Nordmann. 2005. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (1):202-208.

Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann. 2010. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (1):24-38.

Poirel, L., and P. Nordmann. 2006a. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12 (9):826-836.

Poirel, L and P. Nordmann. 2006b. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (4):1442-1448.

Poirel, L., J. D. Pitout, and P. Nordmann. 2007. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2 (5):501-512.

Post, V., P. A. White, and R. M. Hall. 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65 (6):1162-1170.

Potron, A., L. Poirel, and P. Nordmann. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45 (6): 568-585.

Queenan, A. M., and K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Reviews* 20 (3):440-458.

Riccio, M. L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2000. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (5):1229-1235.

Robledo, I. E., E. E. Aquino, M. I. Sante, J. L. Santana, D. M. Otero, C. F. Leon, and G. J. Vazquez. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (3):1354-1357.

Sabat, A. J., A. Budimir, D. Nashev, R. Sa-Leao, J. van Dijl, F. Laurent, H. Grundmann, and A. W. Friedrich. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18 (4):20380.

Saeed, S., M. G. Fakih, K. Riederer, A. R. Shah, and R. Khatib. 2006. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27 (9):981-983.



Schmidt, H., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17 (1):14-56.

Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 (1):67-75.

Segal, H., S. Gorny, and B. G. Elisha. 2005. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 243 (2):425-429.

Seifert, H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, and M. Vaneechoutte. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 35 (11):2819-2825.

Seputiene, V., J. Povilonis, and E. Suziedeliene. 2012. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (4):1969-1973.

Sevillano, E., L. Gallego, and J. M. Garcia-Lobo. 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol* 57 (6):493-495.

Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley, and M. J. Zervos. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19 (3):512-530.

Stokes, H. W., D. B. Ogorman, G. D. Recchia, M. Parsekhian, and R. M. Hall. 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 26 (4):731-745.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33 (9):2233-2239.

Tognim, M. C. B., A. C. Gales, A. P. Penteado, S. Silbert, and H. S. Sader. 2006. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27 (7):742-747.

Turton, J. F., M. E. Kaufmann, J. Glover, J. M. Coelho, M. Warner, R. Pike, and T. L. Pitt. 2005. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 43 (7):3074-3082.

Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt. 2006a. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 258 (1):72-77.

Turton, J. F., N. Woodford, J. Glover, S. Yarde, M. E. Kaufmann, and T. L. Pitt. 2006b. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 44 (8):2974-2976.

Urwin, R., and M. C. Maiden. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 11 (10):479-487.

Vasconcelos, A. T., A. L. Barth, A. P. Zavascki, A. C. Gales, A. S. Levin, B. R. Lucarevski, B. G. Cabral, D. M. Brasiliense, F. Rossi, G. H. Furtado, I. C. Carneiro, J. O. da Silva, J. Ribeiro, K. V. Lima, L. Correa, M. H. Britto, M. T. Silva, M. L. da Conceicao, M. Moreira, M. D. Martino, M. R. de Freitas, M. S. Oliveira, M. F. Dalben, R. D. Guzman, R. Cayo, R. Morais, S. A. Santos, and W. M. Martins. 2015. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases

causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*.

Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19 (24):6823-6831.

Vila, J., S. Marti, and J. Sanchez-Céspedes. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 59 (6):1210-1215.

Villalón, P., S. Valdezate, M. J. Medina-Pascual, G. Carrasco, A. Vindel, and J. A. Saez-Nieto. 2013. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother* 68 (3):550-553.

Walsh, T. R. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 21 (4):367-371.

Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* 18 (2):306-325.

Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby. 2006. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57 (3):373-383.

Werneck, J. S., R. C. Picao, C. G. Carvalhaes, J. P. Cardoso, and A. C. Gales. 2011. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* 66 (2):452-454.

Zarrilli, R., S. Pournaras, M. Giannouli, and A. Tsakris. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41 (1):11-19.

Zavascki, A. P., C. G. Carvalhaes, R. C. Picao, and A. C. Gales. 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8 (1):71-93.

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 (5):853-860.

Zhou, H., T. Zhang, D. Yu, B. Pi, Q. Yang, J. Zhou, S. Hu, and Y. Yu. 2011. Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (10):4506-4512.

Zhu, L., Z. Yan, Z. Zhang, Q. Zhou, J. Zhou, E. K. Wakeland, X. Fang, Z. Xuan, D. Shen, and Q. Z. Li. 2013. Complete Genome Analysis of Three *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in China for Insight into the Diversification of Drug Resistance Elements. *PLoS One* 8 (6):e66584.

## 10. ANEXOS

## ANEXO I- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

## COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 130127

**Data da Versão do Projeto:**

**Pesquisadores:**

AFONSO LUIS BARTH

ANDREZA FRANCISCO MARTINS

MARIANA PAGANO PEREIRA

**Título:** Análise da expressão gênica de carbapenemases e caracterização molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* provenientes da cidade de Porto Alegre

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Prof. José Roberto Goldim  
Coordenação CEP/HCPA

Porto Alegre, 25 de abril de 2013.

## ANEXO II- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.  
Av. Francisco Teófilo, 506  
CEP 91350-500 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3257-2000  
CNPJ: 02.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO  
Unidade Pediátrica do Hospital Nossa  
Senhora da Conceição S.A.  
CEP 91350-500 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3257-2000  
CNPJ: 02.787.118/0001-20

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.  
Rua Domingos Prates, 20  
CEP 91280-900 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3327-4103  
CNPJ: 92.705.928/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.  
Rua Mauá, 17  
CEP 91633-001 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3316-5200  
CNPJ: 02.693.194/0001-63



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 12 de abril de 2013, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

**Projeto:** 13-029

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**

MARIANA PAGANO PEREIRA

AFONSO LUÍS BARTH

**Título:** Análise da expressão gênica de carbapenemases e caracterização molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii*.

Documentação: Aprovada

Aspectos Metodológicos: Adequados

Aspectos Éticos: Adequados

Parecer final: Este projeto de pesquisa, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (se aplicável), por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO neste CEP.

Porto Alegre, 12 de abril de 2013.

Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP-GHC

## 11. BIOGRAFIA

### Prêmios

Prêmio Newprow no Congresso da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) 2014 com o trabalho intitulado "Primeiro isolado de *Acinetobacter pittii* produtor de NDM-1 na América"

### Produção intelectual no período

#### **Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: Susceptibility Profile and Diversity of Oxacilinases**

Lisiane Rocha, Mariana Pagano, Juliana Coutinho Campos, Jorge Luiz M. Sampaio, Andreza F. Martins, Afonso Luís Barth

Manuscrito submetido à *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*-2016

#### **High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones hospitals from a Brazilian city five years after an outbreak**

Mariana Pagano, MSc, Juliana Barin, MSc, Andreza F. Martins, PhD, Alexandre P. Zavaski, PhD

Manuscrito publicado no *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2015; 7, 860-862.

#### **Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil**

Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado A, Barth AL, Zavascki AP.

Manuscrito publicado no *International Journal of Infectious Disease*, 2014; 25, 79-81.

**Detection of *bla*(GES-5) in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment**

Ribeiro VB, Zavascki AP, Rozales FP, Pagano M, Magagnin CM, Nodari CS, da Silva RC, Dalarosa MG, Falci DR, Barth AL.

Manuscrito publicado no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58, 622-623.

**False-positive results in screening for metallo- $\beta$ -lactamase are observed in isolates of *Acinetobacter baumannii* due to production of oxacilinasas**

Andreza F. Martins, Aline Borges, Mariana Pagano, Libera Maria Dalla-Costa, Afonso L. Barth

Manuscrito publicado no *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2013; 17, 500-501.



