



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

LILIAN RODRIGUES ALVES

**PERFIL DE RESISTÊNCIA, VIRULÊNCIA E PESQUISA DE SISTEMAS DE
EFLUXO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp. PROVENIENTES DE
PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Recife – PE

2017

LILIAN RODRIGUES ALVES

**PERFIL DE RESISTÊNCIA, VIRULÊNCIA E PESQUISA DE SISTEMAS DE
EFLUXO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp. PROVENIENTES DE
PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Recife – PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

C474p Alves, Lilian Rodrigues.
 Perfil de resistência, virulência e pesquisa de sistema de efluxo em
 isolados clínicos de *Acinetobacter* SSP. provenientes de pacientes
 oncológicos / Lilian Rodrigues Alves. – 2017.
 116 f. : il. ; 30 cm.

 Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.
 Inclui Referências, apêndices e anexos.

 1. *Acinetobacter*. 2. Resistência a Múltiplos Medicamentos. 3. Virulência.
 I. Maciel, Maria Amélia Vieira. (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-33)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)¹

LILIAN RODRIGUES ALVES

**PESQUISA DOS SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGA EM ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter spp.* PROVENIENTES DE PACIENTES ONCOLÓGICOS INTERNADOS
EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 20/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Nilma Cintra Leal (Examinadora Interna)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof^a. Dr^a. Alexsandra Maria Lima Scavuzzi (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

¹ Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE - Brasil. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

DOCENTES PERMANENTES

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlăudia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Dedico,

*Aos meus pais Carlos Alberto e
Nadira Rodrigues por todo o amor,
carinho, compreensão, apoio, educação,
incentivo e por serem a base de
todas as minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai Eterno e Nossa Senhora da Conceição, por me iluminarem e protegerem todos os dias de minha vida;

À Prof^a. Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel, por todos os anos de convivência, incentivo, aprendizado e orientação. Por ser uma mãe científica para mim e todos os seus alunos. Desejo que nossa parceria e amizade permaneçam por toda a minha trajetória.

À Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes, pelos anos de co-orientação e contribuições para o meu crescimento acadêmico.

À Dr^a Nilma Cintra Leal, pela colaboração, atenção, gentileza e por tornar possível a execução do sequenciamento genômico no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz.

Aos meus pais, irmão e demais familiares, por não me deixarem desanimar diante das dificuldades diárias e por me impulsionarem a alçar voos cada vez mais altos.

À Carina Mendes, Felipe Lira, Danilo Elias, Antônio Rezende, Túlio Campos e demais pesquisadores do Projeto Genoma *Acinetobacter*, que contribuíram de forma significativa para o meu aprendizado e crescimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio, pela parceria no projeto.

Aos funcionários de CIAC, especialmente à Dr^a Jesuíta e à Fernanda, pela contribuição inestimável no isolamento e identificação dos isolados bacterianos utilizados neste estudo.

Aos professores e funcionários que fazem a Disciplina de Microbiologia, pelos ensinamentos, amizade e momentos de diversão que tivemos juntos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Tropical, pela contribuição na minha formação acadêmica, em especial a Walter Leite, por toda sua boa vontade e paciência em nos ajudar sempre.

À minha “irmã gêmea”, Larissa Matos, pelos anos de amizade que, mesmo à distância, não deixou de se fazer presente todos os dias e sempre estava disposta a me dar uma palavra amiga nos momentos de dúvida e insegurança.

À família EID, em especial aos meus colegas professores e alunos, por terem me acolhido com tanto carinho e amor. Por serem parte do meu crescimento profissional na docência.

Aos meus “curicas” mais do que especiais, Marcelle Aquino, Jailton Lobo, Armando Monteiro, Jussy Pereira e Valdemir Júnior, por serem a melhor parte do meu dia-a-dia no laboratório. Pelas conversas, risos, contribuições e amizade durante anos. Vocês são os melhores “curicas” do mundo!

Aos colegas de pós-graduação, especialmente Érica Fernandes, Dani Cantarelli e André Nascimento, pela troca de conhecimento, por compartilharem do cansaço durante as intermináveis aulas do mestrado/doutorado e por não me deixarem desistir. Pelos momentos divertidos que passamos juntos e por se fazerem presentes mesmo que os nossos projetos de vida tenham nos separado fisicamente.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a realizar este trabalho.

RESUMO

Acinetobacter spp. é um patógeno essencialmente oportunista e está envolvido em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), mais frequentemente em pacientes imunocomprometidos, bem como em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, queimados e em tratamento com quimioterapia antineoplásica. Os mais frequentes sítios de infecção são o trato respiratório, principalmente quando associado à ventilação mecânica, trato urinário, corrente sanguínea, feridas e queimaduras. Os mecanismos que conferem resistência a espécies bacterianas de *Acinetobacter* são diversos e podem ser divididos em três grupos: produção de enzimas capazes de inativar a atividade dos agentes antimicrobianos, alterações ou perda de porinas e aumento da expressão de sistemas ativos de efluxo. Entretanto, os mecanismos de virulência presentes em bactérias do gênero *Acinetobacter* ainda não são claros. Poucos fatores de virulência foram identificados e caracterizados neste gênero bacteriano, mas sabe-se que os genes envolvidos na biossíntese de *pílus*, cápsula, sideróforos, fímbrias e biofilme estão presentes em vários isolados clínicos de *Acinetobacter*, contribuindo para a sua persistência no ambiente hospitalar e no estabelecimento e progressão da infecção. Portanto, este trabalho teve como objetivo pesquisar determinantes genéticos de virulência e resistência em isolado de *Acinetobacter nosocomialis* sensível, além de determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a ocorrência dos sistemas de efluxo e seus reguladores através de sequenciamento genômico dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes, provenientes de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento do câncer na cidade de Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014. Foram selecionados para o estudo seis isolados de *Acinetobacter*, sendo um isolado de *Acinetobacter nosocomialis* sensível aos antimicrobianos e cinco isolados de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistente. Foram determinados os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos pela concentração inibitória mínima (CIM) e realizado o sequenciamento genômico para a pesquisa dos determinantes genéticos de resistência e virulência. Nos cinco isolados multidroga resistentes, os antimicrobianos com maiores taxas de resistência (83,3%) foram ceftriaxona, ceftazidima, imipenem, meropenem e ciprofloxacina seguidos pelo cefepime (66,6%), amicacina e gentamicina (50,0%). Os antimicrobianos mais ativos contra os isolados de *A. baumannii* testados foram ampicilina/sulbactam, levofloxacina e polimixina B. Em relação aos sistemas de efluxo foram encontrados genes que codificam as bombas das famílias MATE, RND e MFS nos isolados resistentes, além de outros mecanismos de

resistência associados como mutações nos genes *gyrA* e *parC* (QRDRs), e a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ambos detectados em nossos isolados. No isolados de *A. nosocomialis* foram detectados genes que codificam ou contribuem para a formação de alguns dos fatores de virulência que são associados à colonização e estabelecimento do início da infecção a exemplo de genes associados à formação de *pilus* e biofilme, além dos genes que codificam bombas de efluxo da família RND, cefalosporinase, aminoglicosídeo fosfotranferase e gene de resistência à sulfonamidas. Este estudo ressalta a importância da investigação genética dos determinantes de resistência e virulência em isolados clínicos de *Acinetobacter* sensíveis ou resistentes que, quando expressos conjuntamente, podem dificultar o tratamento e consequentemente favorecer um mau prognóstico para o paciente.

Palavras-chaves: *Acinetobacter*; resistência a múltiplos medicamentos; virulência.

ABSTRACT

Acinetobacter spp. is an essentially opportunistic pathogen and is involved in cases of health care-related infections (IRAS), most often in immunocompromised patients, as well as in patients admitted to intensive care units, burned and treated with antineoplastic chemotherapy. The most frequent sites of infection are the respiratory tract, especially when associated with mechanical ventilation, urinary tract, bloodstream, wounds and burns. The mechanisms that confer resistance to bacterial species of *Acinetobacter* are diverse and can be divided into three groups: production of enzymes capable of inactivating the activity of antimicrobial agents, alterations or loss of porins and increased expression of active efflux systems. However, the mechanisms of virulence present in bacteria of the genus *Acinetobacter* are still unclear. Few virulence factors have been identified and characterized in this bacterial genus, but it is known that genes involved in biosynthesis of pilus, capsule, siderophores, fimbriae and biofilm are present in several clinical isolates of *Acinetobacter*, contributing to its persistence in the hospital environment and in the establishment and progression of infection. The aim of this study was to investigate genetic determinants of virulence and resistance in susceptible *Acinetobacter nosocomialis* isolates, as well as to determine the susceptibility profile to antimicrobials, the occurrence of efflux systems and their regulators through genomic sequencing of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates resistant multidrug antibiotics from patients admitted to a public referral hospital for cancer treatment in the city of Recife, Pernambuco, during the year 2014. Six isolates of *Acinetobacter* were selected for the study, being an antimicrobial-sensitive isolate of *Acinetobacter nosocomialis* and five isolates of *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant. Antimicrobial susceptibility profiles were determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and genomic sequencing was performed to investigate the genetic determinants of resistance and virulence. In the five resistant multidrug isolates, the antimicrobials with the highest resistance rates (83.3%) were ceftriaxone, ceftazidime, imipenem, meropenem and ciprofloxacin followed by cefepime (66.6%), amikacin and gentamicin (50.0%). The most active antimicrobials against *A. baumannii* isolates tested were ampicillin / sulbactam, levofloxacin and polymyxin B. In the efflux systems, genes coding for MATE, RND and MFS families were found in resistant isolates, as well as other mechanisms associated with mutations in the *gyrA* and *parC* (QRDRs) genes, and the presence of aminoglycoside modifying enzymes, both detected in our isolates. In the isolates of *A. nosocomialis*, genes encoding or contributing to the formation of some of the virulence factors

associated with colonization and establishment of the onset of infection have been detected, such as genes associated with pilus and biofilm formation, as well as the genes that encode efflux pumps from the RND family, cephalosporinase, aminoglycoside phosphotransferase and sulfonamide resistance gene. This study underscores the importance of genetic investigation of the determinants of resistance and virulence in sensitive or resistant clinical isolates of *Acinetobacter* that, when expressed together, can make treatment difficult and therefore favor a poor prognosis for the patient.

Key-words: *Acinetobacter*; multiple drug resistance; virulence.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Potenciais mecanismos de resistência antimicrobiana em <i>Acinetobacter</i> spp.	25
Figura 2. Representação esquemática dos operons que codificam os sistemas de efluxo RND em <i>A. baumannii</i> .	39
Figura 3. Esquema representativo da técnica de extração de DNA utilizando o Kit Brazol	44

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição das espécies pertencentes ao gênero <i>Acinetobacter</i>	21
Tabela 2. Dados dos primeiros exemplares de cada subclasse de MβL descritas até o presente momento.	29
ARTIGO 1	
Tabela 1. Caracterização dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> quanto ao sítio e setor de isolamento, perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de sistemas de efluxo multidroga	50
Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> por microdiluição em caldo	51
ARTIGO 2	
Tabela 1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos do isolado clínico de <i>Acinetobacter nosocomialis</i> (Acb_11/48) por microdiluição em caldo.	61
Tabela 2. Genes de resistência e virulência presentes no isolado de <i>Acinetobacter nosocomialis</i> (Acb_11/48) determinados por sequenciamento genômico	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Família <i>ATP binding cassette</i>
AIM	Imipenemase Australiana
ARI	<i>Acinetobacter</i> resistente ao imipenem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
Bla	Genes que codificam β -lactamase
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais
CTX-M	Cefotaximase
DIM	Imipenemase Holandesa
DMT	Superfamília <i>drug/metabolite transporter</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BEM	Ágar eosina azul de metileno
ESBL	B-lactamase de espectro estendido
GES	Guiana <i>extended spectrum</i>
GIM	Imipenemase Alemã
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
IS	Sequência de inserção
ISAb_a	Sequência de inserção <i>Aba</i>
kDA	Quilodalton
KHM	Metalo- β -lactamase do Hospital Kyorin
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -carbapenemase
MβL	Metalo- β -lactamase
MATE	Família <i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MDR	Multidroga resistente
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
NDM	Metalo- β -lactamase de Nova Deli
NGS	Sequenciamento genômico de última geração
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
ORF	Quadro aberto de leitura
OXA	Oxacilinase
PER	<i>Pseudomonas extended resistance</i>

RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SHV	<i><u>S</u>ulph<u>h</u>ydryl <u>v</u>ariable</i>
SIM	Imipenemase de Seul
SMR	Família <i>small multidrug resistance</i>
SPM	Metalo- β -lactamase de São Paulo
TEM	Temoniera β -lactamase
TMB	Metalo- β -lactamase de Tripoli
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VEB	<i>Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase</i>
VIM	Imipenemase de Verona

SUMÁRIO

	PÁGINA
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Gênero <i>Acinetobacter</i>	20
2.2 Importância clínica em pacientes oncológicos	23
2.3 Fatores de virulência	24
2.4 Mecanismos de resistência	25
2.4.1 <u>β-lactamases</u>	26
2.4.1.1 <i>β-lactamases de espectro estendido (ESBLs)</i>	27
2.4.1.2 <i>Metallo-β-Lactamases (MβLs)</i>	28
2.4.1.3 <i>Oxacilinas</i>	30
2.4.2 <u>Sequência de Inserção ISAba1</u>	33
2.4.3 <u><i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase - KPC</u>	34
2.4.4 <u>Porinas</u>	35
2.4.5 <u>Sistemas de efluxo</u>	36
2.5 Sequenciamento genômico	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Desenho do Estudo	42
4.2 Local do Estudo	42
4.3 População Alvo	42
4.4 Isolados bacterianos	42
4.5 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	43
4.6 Extração de DNA total	43
4.7 Preparação de bibliotecas de DNA e sequenciamento genômico	44
4.8 Montagem e anotação dos genomas	45

5 RESULTADOS	46
5.1 Artigo 1: Detecção genética de sistemas efluxo multidroga em isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> provenientes de pacientes com câncer, internados em Recife, Pernambuco, Brasil.	46
5.2 Artigo 2: Ocorrência de determinantes genéticos de virulência e resistência em isolado clínico de <i>Acinetobacter nosocomialis</i> sensível aos antimicrobianos	59
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – Artigo 1 em inglês	93
APÊNDICE B – Artigo 2 em inglês	105
ANEXO A – Parecer Comissão de Ética e Pesquisa (CEP)	114
ANEXO B – Artigo publicado durante o doutorado	116

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. é um dos mais importantes patógenos relacionados às infecções hospitalares, pois são considerados micro-organismos oportunistas, necessitando de alguma falha do sistema imune para causar infecção (SIMHON et al., 2001; RODRÍGUEZ-BAÑO; CISNEROS, 2002; PRASHANTH; BADRINATH, 2006; NWADIKE et al., 2014).

Uma característica importante das espécies de *Acinetobacter* spp. é que estes possuem propensão a desenvolver resistência bacteriana rapidamente e a mesma está associada à pressão seletiva dos agentes antimicrobianos utilizados, limitando assim as opções terapêuticas (AGUSTÍ et al, 2002; LEE et al., 2004; MARAGAKIS et al., 2004; FALAGAS et al., 2007; NWADIKE et al., 2014).

Alguns trabalhos destacam o importante papel de bactérias não fermentadoras no panorama da multirresistência, principalmente em relação às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Dentre essas bactérias, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* são os gêneros de maior importância clínica, pois são os mais isolados em laboratórios de microbiologia e frequentemente demonstram resistência, intrínseca e adquirida, a várias classes de antimicrobianos (BONOMO; SZABO, 2006; PATERSON, 2006; CHAWLA, et al., 2013).

Acredita-se que o surgimento de *Acinetobacter* spp. multidroga resistente deve-se à expressão de mecanismos de resistência como: (1) produção de enzimas que inativam os antimicrobianos, a exemplo das metalo- β -lactamases, oxacilinases e carbapenemases; (2) perda de porinas; (3) e a hiperexpressão dos sistemas de efluxo. Tais mecanismos, quando expressos conjuntamente, levam a um aumento considerável das taxas de resistência aos antimicrobianos (MARAGAKIS; PERL, 2008; PELEG et al., 2008; DERIS et al., 2009; KUMAR et al., 2012).

Vários estudos realizados pelo mundo relatam a presença de enzimas de resistência em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., como as subclasses de metalo- β -lactamases (VIM, IMP, SIM, NDM-1 e SPM-1), oxacilinases (OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143-like), carbapenemases (KPC) (HIGGINS et al., 2009; KARTHIKEYAN et al., 2010; ROBLEDO et al., 2010; PFEIFER et al., 2011; BONNIN et al., 2012; OPAZO et al., 2012; ZHANG et al., 2013; JÁCOME et al., 2016).

Por sua vez, os sistemas de efluxo multidroga contribuem para a resistência múltipla a antimicrobianos em espécies do gênero *Acinetobacter*, sendo os principais sistemas descritos em isolados clínicos: o AdeABC, AdeFGH e AdeIJK (COYNE et al., 2011; RUMBO et al., 2013; LIN et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão da infecção por bactérias do gênero *Acinetobacter* ainda não são claros. Estes micro-organismos possuem poucos fatores de virulência identificados, mas sabe-se que os genes envolvidos na biossíntese de *pílus*, cápsula, sideróforos, fímbrias e biofilme estão presentes em vários isolados clínicos de *Acinetobacter*, contribuindo para a sua persistência no ambiente hospitalar (GORDON; WAREHAM, 2010).

Diante do exposto, a proposta deste estudo foi pesquisar determinantes genéticos de virulência e resistência em isolado de *Acinetobacter nosocomialis* sensível, além de determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a ocorrência dos sistemas de efluxo e seus reguladores através de sequenciamento genômico dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes, provenientes de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento do câncer na cidade de Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014, com o intuito de identificar a realidade local contribuindo com dados microbiológicos e genéticos que possam ser usados como subsídio para o controle das infecções causadas por este micro-organismo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Acinetobacter*

Originalmente proposto por Brisou e Prévot (1954), o gênero *Acinetobacter* (do grego *akinetos*) compreende bactérias gram-negativas, aeróbias estritas, não fermentadoras de carboidrato, não fastidiosas, imóveis, não esporuladas, não pigmentadas, catalase positivas, citocromo-oxidase negativas, que apresentam um conteúdo de G+C variando de 39% a 47% em seu DNA genômico. Com base nos mais recentes dados taxonômicos, foi proposto que os membros do gênero *Acinetobacter* devem ser classificados na família Moraxellaceae pertencente à ordem Gammaproteobacteria, que inclui os gêneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados (BRISOU et al., 1954; ROSSAU et al., 1991; BERGOGNE-BÉRÉZIN et al., 1996; PELEG et al., 2008; DOUGHARI et al., 2011).

Acinetobacter spp. possui uma capacidade de adaptação a ambientes hostis utilizando diferentes fontes de carbono, crescendo em diferentes condições de pH, umidade, temperatura e apresentando resistência a desinfetantes. Tais características associadas à habilidade em aderir e formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas contribuem para este micro-organismo sobreviver por períodos prolongados no ambiente hospitalar, potencializando sua capacidade de disseminação nosocomial e, assim, possibilitando a ocorrência de surtos recorrentes (JUNI, 1978; JAWAD et al., 1998; WISPLINGHOFF et al., 2007; PELEG et al., 2008).

Um grande avanço na longa e complicada história deste gênero foi realizado por Bouvet e Grimont (1986) que, com base em estudos de hibridização de DNA-DNA, publicaram uma classificação contendo grupos ou genoespécies dentre os quais foram dados nomes de espécies formais, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, e *Acinetobacter lwoffii* (PELEG et al., 2008).

A partir desta classificação, vários estudos foram realizados e novas espécies foram identificadas aumentando o número real de espécies descritas para 48, como pode ser observado na tabela a seguir (Tabela 1):

Tabela 1. Descrição das espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter*

Espécie	Referências
<i>Acinetobacter albensis</i>	KRIZOVA et al., 2015a
<i>Acinetobacter apis</i>	KIM et al., 2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter baylyi</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	NEMEC et al., 2009
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	NEMEC et al., 2010
<i>Acinetobacter bohemicus</i>	KRIZOVA et al., 2014
<i>Acinetobacter boissieri</i>	ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2013
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter brisouii</i>	ANANDHAM et al., 2011
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter courvalinii</i>	NEMEC et al., 2016
<i>Acinetobacter dispersus</i>	NEMEC et al., 2016
<i>Acinetobacter equi</i>	POPPEL et al., 2015
<i>Acinetobacter gandensis</i>	SMET et al., 2014
<i>Acinetobacter gerneri</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter grimontii</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter guangdongensis</i>	FENG et al., 2014
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	NEMEC et al., 2010
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	NEMEC et al., 2009
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	LI et al., 2014a
<i>Acinetobacter indicus</i>	MALHOTRA et al., 2012
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter junii</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter kookii</i>	CHOI et al., 2013
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	BOUVET; GRIMONT, 1986
<i>Acinetobacter modestus</i>	NEMEC et al., 2016
<i>Acinetobacter nectaris</i>	ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2013
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	NEMEC et al., 2011
<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	ABBAS et al., 2015

<i>Acinetobacter parvus</i>	NEMEC et al., 2003
<i>Acinetobacter pittii</i>	NEMEC et al., 2011
<i>Acinetobacter plantarum</i>	DU et al., 2016
<i>Acinetobacter populi</i>	LI et al., 2015
<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	NEMEC et al., 2016
<i>Acinetobacter puyangensis</i>	LI et al., 2013
<i>Acinetobacter qingfengensis</i>	LI et al., 2014b
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NISHIMURA et al., 1988
<i>Acinetobacter rudis</i>	VAZ-MOREIRA et al., 2011
<i>Acinetobacter schindleri</i>	NEMEC et al., 2001
<i>Acinetobacter seifertii</i>	NEMEC et al., 2015
<i>Acinetobacter soli</i>	KIM et al., 2008
<i>Acinetobacter tandoii</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter towneri</i>	CARR et al., 2003
<i>Acinetobacter ursingii</i>	NEMEC et al., 2001
<i>Acinetobacter variabilis</i>	KRIZOVA et al., 2015b
<i>Acinetobacter venetianus</i>	VANEECHOUTTE et al., 1999
<i>Acinetobacter vivianii</i>	NEMEC et al., 2016

A. baumannii, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* estão intimamente relacionados e isto dificulta a distinção de uma espécie para outra, partindo de testes fenotípicos convencionais. Portanto, essas espécies podem ser referidas como complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (GERNER-SMIDT et al., 1991; GERNER-SMIDT, 1992; PELEG et al., 2008; PELEG et al., 2012), sendo *A. calcoaceticus* considerado um micro-organismo de origem ambiental, enquanto que as demais espécies deste complexo estão frequentemente associadas a infecções adquiridas em ambiente hospitalar (HENWOOD et al., 2002; CHANG et al., 2005). Particularmente, a espécie *A. baumannii* é a de maior importância epidemiológica, sendo frequentemente isolada em pacientes com Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) (MISBAH et al., 2005).

2.2 Importância clínica em pacientes oncológicos

Dentre as espécies do gênero *Acinetobacter*, *A. baumannii* é reconhecido como o causador de uma ampla variedade de infecções graves adquiridas no ambiente hospitalar, incluindo infecções de tecidos moles, infecções de feridas, infecções urinárias, meningite secundária, pneumonia associada à ventilação mecânica e septicemia (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014).

Devido ao seu caráter essencialmente oportunista, *A. baumannii* é mais frequente em pacientes imunocomprometidos, bem como em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, queimados e em tratamento contra o câncer. Tal característica faz com que as infecções por *A. baumannii* evoluam severamente e com taxas de mortalidade elevadas na maioria dos casos (KARLOWSKY et al., 2003; BUCANEVE et al., 2005; GKRANIA-KLOTSAS; HERSHOW, 2006; JERASSY et al., 2006; DIJKSHOORN et al., 2007).

Cataneo e colaboradores (2011) investigando os critérios para isolamento de pacientes admitidos no Hospital de Câncer de Barretos, observaram que os micro-organismos mais isolados nestes pacientes foram *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Analisando infecções da corrente sanguínea em pacientes neutropênicos no sul da Índia, Babu e colaboradores (2016) observaram que, dos 128 isolados bacterianos obtidos a partir da cultura de sangue, 74 (58%) foram positivos para bacilos Gram-negativos, 51 (40%) positivos para cocos Gram-positivos e 3 (2%) foram positivos para fungos. Entre os micro-organismos Gram-negativos, os mais frequentes foram *E. coli*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

Dados que corroboram com estes achados foram observados por Al-Otaibi e colaboradores (2016) que, avaliando a epidemiologia e os fatores de risco para aquisição de bacteremia por bacilos Gram-negativos em pacientes com câncer na Arábia Saudita, observaram que *E. coli*, *A. baumannii*, *Pseudomonas* spp. e *K. pneumoniae* foram os micro-organismos mais frequentemente isolados.

Um outro estudo publicado recentemente por Jácome e colaboradores (2016) reforça os resultados citados acima, onde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *K. pneumoniae* foram os principais micro-organismos envolvidos em infecções de pacientes com câncer.

Portanto, esses estudos mostram que bactérias do gênero *Acinetobacter*, especialmente a espécie *A. baumannii*, estão entre os patógenos mais frequentemente isolados em casos de infecções relacionadas à assistência à saúde em pacientes com câncer.

2.3 Fatores de virulência

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão da infecção por *A. baumannii* e demais espécies ainda não são claros. O que se sabe é que são necessários alguns fatores moleculares de virulência que incluem a proteína de membrana externa A, fosfolipase D, proteínas associadas à biofilme, *pilus*, cápsula, fímbrias e sideróforos para que haja a colonização e infecção em humanos, assim como a persistência destes micro-organismos no ambiente hospitalar (GORDOM; WAREHAM, 2010; HARDING et al., 2013).

Entre os fatores de virulência anteriormente citados, o biofilme é o mais importante fator de virulência em *A. baumannii*. Uma bactéria produtora de biofilme possui a capacidade de aderir a superfícies bióticas e abióticas, sobrevivendo a condições ambientais desfavoráveis. Esta é uma característica patogênica importante de muitas bactérias hospitalares, pois facilitam a colonização do patógeno e, conseqüentemente, contribuem para a resistência a drogas antimicrobianas e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (GADDY; ACTIS, 2009; GORDOM; WAREHAM, 2010).

Em bactérias do gênero *Acinetobacter*, os determinantes de virulência mais estudados incluem *CsuA/BABCDE* (TOMARAS et al., 2003; DE BREIJ et al., 2009) e a formação do *pilus* tipo IV (KRÖGER et al., 2017).

O sistema de montagem *csuA/BABCDE* regulado pelo *two-component system* (TCS) *bfmRS* está envolvido na formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, permitindo que bactérias do gênero *Acinetobacter* possam sobreviver a condições ambientais desfavoráveis (NHO et al., 2015; KRÖGER et al., 2017). Se o sistema *csuA/BABCDE* é necessário para que haja a ligação ao tecido do hospedeiro ainda não está claro. Segundo estudo realizado por De Breij e colaboradores (2009), o sistema *csuA/BABCDE* presente em *A. baumannii* não estava envolvido na adesão a células epiteliais humanas. Entretanto, Liou e colaboradores (2014) observaram uma perda na capacidade de adesão de *A. baumannii* as células epiteliais alveolares humanas, após a deleção do gene regulador deste sistema – *bfmS*.

Filamentos protéicos chamados *pili* estão envolvidos na ligação de espécies de *Acinetobacter* a superfícies bióticas ou abióticas e, conseqüentemente, na formação de biofilmes, conferindo a estas bactérias uma notável capacidade de sobreviver a condições ambientais adversas. A formação do *pilus* tipo IV é feita por monômeros de uma proteína chamada pilina, codificada pelo gene *pilA*. A montagem e desmontagem deste *pilus* é feita por duas ATPases, *pilB* e *pilT* (TAN et al., 2014; KRÖGER et al., 2017). Os genes *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilG*, *pilH*, *pilI*, *pilJ*, *pilT*, *pilU* e *pilZ* codificam o *pilus* tipo IV, que está diretamente envolvido

nos processos de transformação natural bacteriana e espasmos de motilidade, além de estar associado à produção de biofilme bacteriano em superfície plástica (RICHMOND et al., 2016).

2.4 Mecanismos de Resistência

Os mecanismos que conferem resistência a espécies de *Acinetobacter* podem ser divididos em três grupos: produção de enzimas capazes de inativar a atividade dos antimicrobianos; perda de porinas, que são proteínas de membrana externa e que funcionam como canais pelos quais os antimicrobianos atingem o seu sítio de ação; e aumento da expressão de sistemas ativos de efluxo, que consistem em um sistema composto por proteínas capazes de expulsar os antimicrobianos do meio intracelular (Figura 1) (BONOMO; SZABO, 2006).

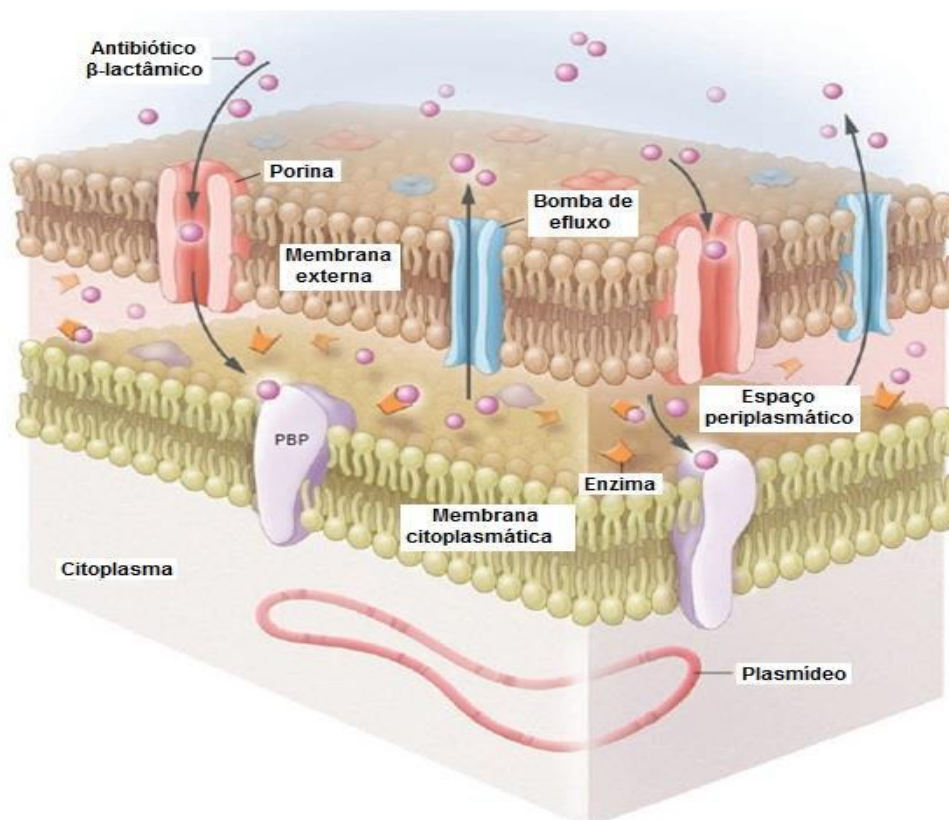


Figura 1. Potenciais mecanismos de resistência antimicrobiana em *Acinetobacter* spp.

Fonte: Adaptado de Munoz-Price e Weinstein (2008)

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ou adquiridos e ambos têm sido observados em espécies de *Acinetobacter* spp. Esses mecanismos são provenientes da evolução bacteriana e da pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos. Adicionalmente a estes fatores está a flexibilidade genética deste micro-organismo em captar elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, e utilizá-los em benefício próprio com a

finalidade de resistir à ação dos mais diversos agentes antimicrobianos fazendo com que surjam bactérias multidroga resistentes (MDR) (LIVERMORE, 2001; LIVERMORE; BROWN, 2001; VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; PELEG et al., 2008; CHUANG et al., 2009).

Vallenet e colaboradores (2008) sequenciaram o genoma de três cepas distintas de *Acinetobacter*, sendo duas da espécie *A. baumannii*, que foram isoladas de humanos e uma cepa ambiental, oriunda do solo, de *A. baylyi*, usada como referência. Uma das cepas de *A. baumannii* era MDR e a outra sensível a inúmeros agentes antimicrobianos. Após sequenciamento, demonstrou-se que a cepa MDR apresentava uma grande “ilha de resistência” (cerca de 86-kb) onde estavam localizados 45 dos 52 genes de resistência até então identificados. Também foram identificados elementos genéticos móveis, como plasmídeos e sequências de inserção. Em contraste, a “ilha de resistência” não estava presente na cepa de *A. baumannii* sensível. Tal resultado indica que existe uma plasticidade genômica em bactérias do gênero *Acinetobacter* spp., tornando-o bastante complexo e diverso.

Uma característica importante das infecções por *Acinetobacter* spp. é sua resistência à maioria dos antimicrobianos utilizados na rotina médica, tornando cada vez mais difícil o tratamento dessas infecções. Desde o início da década de 80, demonstrou-se um aumento considerável nas taxas de resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. Inicialmente, esses isolados demonstraram resistência a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefamicina, tetraciclina, aminoglicosídeos e cloranfenicol. Desde então, com o surgimento de novos antimicrobianos, os isolados de *Acinetobacter* spp. demonstram-se cada vez mais resistentes, tornando-o um importante patógeno hospitalar. Recentemente, aumentou-se a preocupação com isolados de *Acinetobacter* spp. que apresentam resistência aos carbapenêmicos, particularmente ao imipenem. Isto representa um sério problema, pois estes antimicrobianos são considerados como um dos últimos recursos para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes (WALSH et al., 2002; ABBO et al., 2005; SINHA; SRINIVASA, 2007).

2.4.1 β -lactamases

O mais prevalente mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. é a degradação enzimática por β -lactamases, enzimas que inativam estes antimicrobianos pela quebra do anel β -lactâmico. No entanto, de acordo com a natureza

complexa deste micro-organismo, muitas vezes vários mecanismos trabalham em conjunto para produzir o mesmo fenótipo de resistência (QUALE et al., 2003; PELEG et al., 2008).

A classificação das β -lactamases pode ser definida de acordo com duas propriedades, funcional e molecular. Inicialmente proposta por Bush e colaboradores (1995) e revista por Bush e Jacoby (2010), a classificação das β -lactamases foi realizada de acordo com o substrato requerido e os perfis de inibição destas enzimas, sendo divididas em três grupos, sendo o grupo 1 das cefalosporinases que são inibidas pelo ácido clavulânico; o grupo 2 das penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de amplo espectro que são inibidas pelos inibidores de β -lactamases; e o grupo 3 que são das metalo- β -lactamases (M β LS) que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam.

A classificação baseada a partir da homologia na sequência de aminoácidos foi proposta por Ambler (1980) quando somente quatro sequências de aminoácidos de β -lactamases eram conhecidas. Assim, foram propostas somente as classes A das penicilinas e a classe B das M β LS. Um estudo posterior, realizado por Jaurin e Grundstrom (1981), descreveu a classe C das cefalosporinas e a classe D das oxacilinas, as quais foram criadas a partir das serino- β -lactamases (BUSH et al., 1995).

2.4.1.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas capazes de hidrolizar monobactâmicos e cefalosporinas de amplo espectro, sendo inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. As ESBLs possuem a capacidade de conferir resistência aos carbapenêmicos a baixos níveis. (BUSH; JACOBY, 2010).

Existem mais de 300 variantes de ESBLs descritas, sendo as do tipo VEB, PER, TEM, GES, SHV e CTX-M, as mais frequentes em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. (PELEG et al., 2008; MOUBARECK, et al., 2009; GORDON; WAREHAM, 2010).

A enzima PER-1 foi a primeira ESBL a ser descrita em *Acinetobacter* spp. na Europa e na Ásia, seguida da detecção de outra ESBL do tipo VEB-1, detectada pela primeira vez em *A. baumannii*. Essas enzimas foram detectadas em um único clone epidêmico, responsável por um surto em um hospital em Valência, na Espanha (VAHABOGLU et al, 1997; YONG et al, 2003; POIREL et al, 2003).

Com o passar dos anos, vários estudos detectaram novas ESBLs em *Acinetobacter* spp. como: PER-2, PER-7, VEB-1, VEB-1a, VEB-3, SHV-5, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-15, TEM-92, GES-11, GES-12, GES-14 (CARVALHO, 2013).

Por ser um mecanismo de resistência mediado por plasmídeo e de fácil transmissão entre bactérias, a detecção de ESBL possui um grande valor clínico. A presença de micro-organismos produtores de ESBL limita as opções terapêuticas, pois aumenta o espectro de resistência para cefalosporinas de terceira e quarta geração, podendo favorecer um maior uso de carbapenêmicos (BUSH, 2001).

2.4.1.2 Metallo- β -Lactamases (M β LS)

As M β LS são as carbapenemases de maior diversidade molecular e consistem em uma grande ameaça clínica, pois estão presentes com maior frequência em bactérias isoladas de pacientes hospitalizados (WALSH, 2010). Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fatores enzimáticos, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes (MENDES et al., 2006). Além disso, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático, a exemplo do ácido 2-mercaptopropiônico. Portanto, estas enzimas escapam da ação de inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (WALSH et al., 2005, GANTA et al., 2009).

As M β LS podem hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos, como o aztreonam, porém atualmente muitos isolados clínicos estão apresentando uma série de β -lactamases de tal forma que a panresistência aos β -lactâmicos é um fenômeno comum em alguns países como a Índia e a Grécia (WALSH, 2010).

A primeira M β L foi descrita em 1966 em um isolado de *Bacillus cereus*, estando seu gene localizado no cromossomo bacteriano (SABATH; ABRAHAM, 1966; KUWABARA; ABRAHAM, 1967; HUSSAIN et al., 1985) e apenas 25 anos depois, em 1991, foi isolada a primeira M β L em um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por genes plasmidiais, ficando esta conhecida como IMP-1 (WATANABE et al., 1991; OSANO et al., 1994). Com o surgimento das M β LS mediadas por plasmídeos em patógenos de importante relevância clínica, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e membros da família Enterobacteriaceae em vários países, este mecanismo de resistência tornou-se um sério problema de saúde pública, uma vez que limita as opções terapêuticas para infecções causadas

por estes patógenos (BUSH, 2001; JONES et al., 2005; ROSSOLINI, 2005; WALSH et al., 2005). Um dado importante é o fato de muitos destes genes de MβLs estarem presentes em espécies ambientais, constituindo, de certa forma, reservatórios de genes de resistência (BEBRONE, 2007).

Estas enzimas pertencem à classe molecular B, segundo a classificação de Ambler (1980). Outras classificações para as MβL foram surgindo com o tempo, como a de Bush (1989) que classificou as mesmas no grupo 3, segundo as suas propriedades bioquímicas, característica que foi reforçada em 1995 com a classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros. Com o surgimento de novas MβLs, Rasmussen e Bush (1997) propuseram a divisão do grupo 3 de acordo com o perfil de hidrólise para os carbapenêmicos e outros β-lactâmicos em três novos subgrupos: o subgrupo 3a, que inclui as MβLs com amplo espectro de atividade; o subgrupo 3b, que compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenêmicos; e o subgrupo 3c, composto pelas enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e com elevada capacidade de hidrolisar as cefalosporinas. Contudo, o sequenciamento genético das MβLs levou Galleni e colaboradores (2001) a proporem um novo esquema de classificação numérico e subdividiram o grupo 3 em 3 subclasses: B1, B2, e B3, esquema este que foi atualizado por Garau e colaboradores (2004) após a elucidação da estrutura tridimensional de algumas MβLs, representantes de cada subclasse, porém este esquema de classificação, segundo Walsh e colaboradores (2005), não é adequado para classificar todas as MβLs. Desta forma, em 2010, Bush e Jacoby revisaram a classificação dos mesmos de 1995, mantendo a subdivisão por perfil de hidrólise das MβLs (3a, 3b e 3c) e ampliando o arsenal de enzimas inseridas em cada subclasse.

Atualmente dez subclasses de MβLs clinicamente importantes foram identificadas. A Tabela 2 descreve os primeiros casos de cada MβL, identificados em patógenos clinicamente importantes.

Tabela 2. Dados dos primeiros exemplares de cada subclasse de MβL descritas

Enzima MβL	Micro-organismo (1º isolamento)	Cidade/País	Ano ^a	Referências
IMP-1 (Imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Okasaki/ Japão	1991	OSANO et al., 1994
VIM-1 (Verona imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Verona/ Itália	1997	LAURETTI et al., 1999
SPM-1 (São Paulo metalo-β-lactamase)	<i>P. aeruginosa</i>	São Paulo/ Brasil	2001	TOLEMAN et al., 2002

GIM-1 (German imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Dusseldorf/ Alemanha	2004	CASTANHEIRA et al., 2004
SIM-1 (Seoul imipenemase)	<i>A. baumannii</i>	Seul/ Coréia	2003/ 2004	LEE et al., 2005
AIM-1 (Australian imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Adelaide/ Austrália	2002	YONG et al., 2007
KHM-1 (Kyorin Hospital metalo- β - lactamase)	<i>C. freundii</i>	Tokyo/ Japan	1997	SEKIGUCHI et al., 2008
NDM-1 (New Delhi metallo- β lactamase)	<i>K. pneumoniae</i>	Nova Deli/ Índia	2008	YONG et al., 2009
DIM-1 (Dutch imipenemase)	<i>P. stutzeri</i>	Amsterdam/ Holanda	2007	POIREL et al., 2010a
TMB-1 (Tripoli metalo- β -lactamase)	<i>A.xylosoxidans</i>	Tripoli/Libia	2012	EL SALABI et al., 2012

Nota: ^aAno = ano do primeiro isolamento

<i>A. baumannii</i> = <i>Acinetobacter baumannii</i> ;	<i>P. aeruginosa</i> = <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>K. pneumoniae</i> = <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i> = <i>Citrobacter freundii</i>
<i>A. xylosoxidans</i> = <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>P. stutzeri</i> = <i>Pseudomonas stutzeri</i>

Em isolados de *Acinetobacter* spp. poucos estudos têm detectado a presença de M β LS, mas foram encontrados os seguintes genes relacionados com a produção destas enzimas neste micro-organismo: VIM-1, VIM-2 e IMP-1 (YUM et al., 2002; GALES et al., 2003a; FRITSCHÉ et al., 2005); IMP-2 (HALL et al., 2004; FRITSCHÉ et al., 2005); IMP-4 (CHU et al., 2001; HOUANG et al., 2003; HALL et al., 2004); IMP-5 (DA SILVA et al., 2002; HALL et al., 2004); SIM-1 (LEE et al., 2005); NDM-1 (KARTHIKEYAN et al., 2010; PFEIFER et al., 2011; BONNIN et al., 2012; ZHANG et al., 2013); SPM-1 (JÁCOME et al., 2016).

No Brasil, há relatos da presença de M β L da subclasse IMP-1 em isolado clínico de *A. baumannii*, que foi relacionado a um surto em um hospital escola na cidade de São Paulo (GALES et al., 2003a). Outros estudos detectaram a presença da enzima IMP-1 em isolados de *Acinetobacter* spp. (FRITSCHÉ et al., 2005; SADER et al., 2005; TOGNIM et al., 2006).

Recentemente, Jácome e colaboradores (2016) detectaram pela primeira vez no Brasil a enzima SPM-1 em um isolado clínico de *Acinetobacter* spp. proveniente de um paciente internado para tratamento de câncer.

2.4.1.3 Oxacilinas

As oxacilinas são β -lactamases pertencentes à classe D, a qual se subdivide em três subclasses: 2d, que confere resistência a cloxacilina; 2de que confere resistência às

cefalosporinas de espectro estendido e 2df, que confere resistência aos carbapenêmicos (BUSH; JACOBY, 2010).

As que exibem atividade carbapenemase são freqüentemente encontrados em *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, embora haja crescentes relatos de Enterobacteriaceae, em particular, *Klebsiella pneumoniae* (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; HIGGINS et al., 2010; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Curiosamente, a propagação de *Acinetobacter* spp. carbapenemase-positiva parece ser devido à difusão de determinados clones de bactérias (ZHOU et al., 2007; STOEVA et al., 2008), diferente das carbapenemases de classe D em Enterobacteriaceae, que são disseminadas de cepa para cepa através a partir plasmídeos (CARRER et al., 2010).

O nível de atividade carbapenemase exibida pelas oxacilinas é consideravelmente mais fraco, quando comparado à atividade hidrolítica das M β L, e isolados que exibem as oxacilinas requerem mecanismos adicionais de resistência para causar um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos (TOWNER; LVI; VLASSIADI, 2008).

O primeiro isolado do gênero *Acinetobacter* produtor de serina- β -lactamase capaz de hidrolisar imipenem foi proveniente da Escócia, do ano de 1985, e se tratava de um *A. baumannii*. Inicialmente, esta enzima foi denominada de ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*) e foi localizada em um grande plasmídeo. Após o estudo do seu sequenciamento genético, verificaram a similaridade com os membros da família OXA, sendo então denominada de OXA-23 (PATON et al., 1993; DONALD et al., 2000).

Os subtipos de OXA que possuem elevada similaridade genética fazem parte de um mesmo subgrupo filogenético. Em isolados de *A. baumannii* foram descritas OXA de cinco subgrupos filogenéticos: OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143-like (BROWN; AMYES, 2006; PELEG et al., 2008; HIGGINS et al., 2009; OPAZO et al., 2012; GIRLICH et al., 2014).

O subgrupo OXA-23-like tem sido relatado em todo o mundo e é particularmente importante em determinadas regiões geográficas, incluindo a China, onde tem sido relatada recentemente uma rápida disseminação clonal (STOEVA et al., 2008; ZONG et al., 2008; YAN et al., 2010). Este subgrupo inclui o OXA-27 e OXA-49 que são mediados por plasmídeos. Embora reportado principalmente em isolados de *A. baumannii*, em 2002, Bonnet e colaboradores detectaram a presença da OXA-23 em isolado de *Proteus mirabilis* resistente aos carbapenêmicos. Um dado importante é que as enzimas do subgrupo OXA-23-like foram

detectadas em cepas de *A. radioresistens*, podendo este ser o reservatório natural destas enzimas (POIREL et al., 2008; OPAZO et al., 2012).

O gene *bla*_{OXA-23} tem sido identificado em surtos de *A. baumannii* no Brasil, Coréia, Taiti, Reino Unido, Bulgária, Taiwan, Itália, França, China, Índia, Singapura e Hong Kong (DALLA-COSTA et al., 2003; QUEENAN; BUSH, 2007; MARTINS et al., 2009; MENDES et al., 2009; STOEVA et al., 2009; YANG et al., 2009).

O subgrupo OXA-40-like, originalmente chamado de OXA-24-like, pode ser cromossômico ou plasmidial e aparece menos difundido do que OXA-23, geralmente com relatos restritos à Europa e Estados Unidos. Este subgrupo inclui o OXA-25, OXA-26 e OXA-72, identificados em plasmídeos e não estão associados a sequências de inserção (MENDES et al., 2009; OPAZO et al., 2012).

De longe, o maior subgrupo é o OXA-51-like que corresponde a enzimas codificadas em cromossomos e que ocorrem naturalmente *A. baumannii*. Estas enzimas diferem entre si por 1 a 15 aminoácidos (OPAZO et al., 2012). Este subgrupo é composto por enzimas intrínsecas ao *A. baumannii* e é utilizado na identificação desta espécie bacteriana, separando-a das demais que compõem o complexo *A. baumannii-calcoaceticus* (HÉRITIER et al., 2005).

O subgrupo OXA-58-like é geneticamente diferente e tem sido relatado em muitos países ao redor do mundo, com surtos esporádicos. Tal fato pode ser explicado pela sua localização plasmidial. Dentro deste subgrupo foram descritas duas variantes: OXA-96 e OXA-97 (POIREL; NORDMANN, 2006a; CASTANHEIRA et al., 2008; HIGGINS et al., 2010; OPAZO et al., 2012).

Em 2009, Higgins e colaboradores relataram um novo tipo de oxacilinase, a OXA-143, descrita em linhagens resistentes aos carbapenêmicos de *A. baumannii* isoladas no Brasil em 2004. Esta enzima foi localizada em um plasmídeo de 30 kb e tem 88% de homologia de sequência de aminoácidos com OXA-40, 63% com OXA-23 e 52% com OXA-58, o que representa um novo subgrupo de oxacilinase (OPAZO et al., 2012).

Em 2014, Girlich e colaboradores identificaram uma nova variante da enzima OXA-143, a OXA-253. Esta enzima foi identificada em um isolado clínico de *A. baumannii* (ST113) no Brasil, apresentando 93,8% de identidade com a OXA-143.

Uma alta frequência desta enzima tem sido detectada em isolados clínicos de *A. baumannii* no Brasil, como mostra o estudo realizado por Cavalcanti e colaboradores (2017). Neste estudo, 31 isolados clínicos de *A. baumannii* coletados entre os anos de 2010 e 2014, procedentes de cinco hospitais públicos em Recife, possuíam o gene *bla*_{OXA-253} em seu genoma.

2.4.2 Sequência de Inserção IS*Aba1*

As sequências de inserção (IS – *Insertion Sequence*) são os menores e mais abundantes elementos transponíveis. Estes elementos podem conter fortes promotores que desempenham um papel importante na expressão dos genes de resistência a antimicrobianos, os quais estão localizados próximos ao local de inserção destes elementos. Uma sequência de inserção foi identificada em *A. baumannii*, denominada IS*Aba1* (*Insertion Sequence Acinetobacter baumannii*) (SOHRABI et al., 2012).

Diferentes IS têm sido descritas em espécies do gênero *Acinetobacter*, cada uma em associação com genes específicos, desempenhando importante papel no desenvolvimento da resistência aos carbapenêmicos (POIREL; NORDMANN, 2006a; 2006b; TURTON et al., 2006; FEIZABADI et al., 2008; MUGNIER et al., 2008; SOHRABI et al., 2012). As mais conhecidas são IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS*Aba4*, onde IS*Aba1* parece estar relacionada unicamente com a espécie *A. baumannii* (PELEG et al. 2008).

A introdução da sequência de inserção IS*Aba1* pode agir como um forte promotor aumentando a expressão dos genes (POIREL; NORDMANN, 2006b; TURTON et al., 2006; SOHRABI et al., 2012). Os grupos OXA-23, OXA-51 e OXA-58 possuem com frequência associação com essas IS. Dentre eles, o OXA-23 é o mais comum e frequentemente associado as IS*Aba1* e IS*Aba4* (POIREL; NORDMANN, 2006b; TURTON et al., 2006; BOGAERTS et al., 2008; MUGNIER et al., 2010; SOHRABI et al., 2012). Tem sido relatado a associação do grupo OXA-51 com os elementos de inserção IS*Aba1* e IS*Aba9*, proporcionando sequências promotoras para a expressão de alto nível desta enzima (TURTON et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2009; SOHRABI et al., 2012). As sequências promotoras que desempenham importante papel na expressão de OXA-58 foram descritas como IS*Aba1*, IS*Aba2* e IS*Aba3* (POIREL; NORDMANN, 2006a; 2006b; TURTON et al., 2006; BERTINI et al., 2007; GUR et al., 2008; SOHRABI et al., 2012).

De acordo com Segal e colaboradores (2005), a alta detecção de IS*Aba1* em *Acinetobacter* spp. reflete a motilidade do elemento e indica que os eventos de transposição devem ocorrer com frequência, sugerindo plasticidade do genoma das espécies deste gênero, podendo causar uma variedade de rearranjos genômicos.

2.4.3 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC

Dentre as carbapenemases do grupo A, o subgrupo clinicamente mais importante é o da enzima KPC, que compreende 24 variantes identificadas até o momento (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; LAHEY, 2017). A KPC está envolvida em surtos endêmicos e pseudo-endêmicos em regiões dos EUA e Israel, que em alguns casos foram causado por clones relacionados (WOODFORD et al., 2004; LEAVITT et al., 2007; NAVON-VENEZIA et al., 2009; HIRSCH; TAM, 2010). Outras áreas com altas taxas de prevalência é a província de Zhejiang, da China continental, embora isto ocorra provavelmente devido a sistemas de vigilância inconsistentes em diferentes regiões e, portanto, pode se prever que as taxas de outras províncias, são mais elevadas do que as estimadas (ZHANG et al., 2007; QI et al., 2010; WU et al., 2010). O mesmo vem acontecendo na Europa, aonde as enzimas KPC vêm sendo cada vez mais detectadas, porém, é impossível determinar se este crescimento é devido ao aumento na prevalência ou maior conscientização da notificação dos casos (WALSH, 2010).

Isolados KPC-positivos são capazes de hidrolisar diversos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, contudo são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (GOREN et al., 2010; PEIRANO et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Observa-se também que a concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos diminui na presença de ácido clavulânico, devido à inibição da enzima (QUEENAN; BUSH, 2007).

Diversos estudos demonstram que isolados de *Klebsiella pneumoniae* KPC-positivos apresentam redução da susceptibilidade ou resistência a todos os β -lactâmicos, além de serem resistentes a aminoglicosídeos e fluorquinolonas (BRATU et al., 2005; ROCHE et al., 2009; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007) e sensíveis a polimixina B e tigeciclina (LEAVITT et al., 2007; URBAN et al., 2008). Este perfil de resistência limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, restringindo ao uso de tigeciclina e polimixinas (MONTEIRO et al., 2009).

A mobilização do gene *bla*_{KPC} ocorreu através de uma combinação de transferência de plasmídeos e do transposon Tn4401, sempre associados ao gene carbapenemase, embora os elementos adicionais de inserção de outros transposons possam alterar seu ambiente genético imediato (GOOTZ et al., 2009; ROBLEDO et al., 2010). A disseminação das enzimas KPC para além dos Estados Unidos tem ocorrido através da dinâmica da população humana, a exemplo do estudo de Dortet e colaboradores (2008) que relataram isolados KPC-positivo (KPC-2) oriundos da França após o paciente ter sido admitido e ter recebido tratamento em um hospital de Nova York (WALSH et al., 2010).

Todas as enzimas KPC demonstram atividade carbapenemase, e só tinham sido encontradas em membros da família Enterobacteriaceae, todavia, as KPCs foram recentemente identificadas e caracterizadas a partir de isolados de bacilos não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* na Colômbia – KPC-2 (VILLEGAS et al., 2007), Porto Rico – KPC-5 (WOLTER et al., 2009), Trinidad e Tobago – KPC-2 (AKPAKA et al., 2009), nos Estados Unidos – KPC-2 (POIREL et al., 2010b) e no Brasil – KPC-2 (JÁCOME et al., 2012), e também em isolados clínicos do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* provenientes de Porto Rico, onde Robledo e colaboradores (2010) encontraram dez isolados deste complexo positivos para KPC. Após sequenciamento genético observaram a presença de quatro variantes desta enzima: KPC-2, KPC-3, KPC-4 e a nova variante, KPC-10.

2.4.4 Porinas

As bactérias Gram-negativas são responsáveis por uma grande quantidade de casos de infecções multidroga resistentes. Estas bactérias possuem uma parede celular complexa, composta de uma membrana externa e uma interna, que delimitam o espaço periplasmático. A membrana externa possui diversos canais protéicos hidrofílicos, chamados de porinas ou OMPs (“*outer membrane proteins*”). Estes canais A perda ou diminuição da expressão de porinas podem conferir às bactérias diferentes níveis de resistência a certos agentes antimicrobianos (VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008; ZAVASCKY et al, 2010).

Com o passar do anos, as bactérias adaptaram-se para reduzir o influxo através das porinas e, juntamente com a atividade dos sistemas de efluxo, estão se tornando um problema de saúde pública mundial devido às altas taxas de resistência aos antibióticos (PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008).

A multidroga resistência está presente em isolados clínicos de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. Os mecanismos utilizados pelas bactérias para desenvolverem fenótipos de multidroga resistência são: (1) alteração da permeabilidade da membrana externa – porinas; (2) produção de enzimas; (3) sistemas de efluxo. Estes mecanismos podem atuar de modo simultâneo, contribuindo de modo significativo para o aumento do nível de resistência aos antibióticos (LI; NIKAIDO, 2004; DAVIN-REGLI et al., 2008).

A principal porina em *A. baumannii* é uma proteína monomérica chamada OmpAb e pertence à família OmpA-like (VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007).

A perda de três porinas encontradas em *A. baumannii* tem sido relatada com a resistência aos carbapenêmicos. A primeira está associada a perda de uma OMP de 29 kDa, denominada CarO. A perda de outras duas porinas, a Omp33-36 kDa e a porina 43 kDa – que possui homologia com a OprD de *P. aeruginosa* –, foi detectada em isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem que não possuíam ação de enzimas carbapenemases (DEL MAR TOMÁS et al., 2005; VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; LUO et al., 2011).

2.4.5 Sistemas de efluxo

Em bactérias gram-negativas, a membrana externa limita a taxa de antimicrobianos que entram na célula e as bombas de efluxo multidroga exportam vários agentes antimicrobianos, de classes estruturalmente distintas, para fora da bactéria. Os transportadores de efluxo são expressos em todas as células vivas, agindo para protegê-las contra os efeitos tóxicos de produtos químicos orgânicos. A multirresistência bacteriana tem sido muitas vezes associada com a superexpressão destes transportadores. Os antimicrobianos expelidos para fora da célula têm que atravessar a membrana externa de baixa permeabilidade para, assim, entrar novamente na célula bacteriana, contudo as bombas de efluxo e a membrana externa trabalham em sinergia impedindo o retorno deste agente (POOLE, 2002). Os agentes antimicrobianos mais comumente expulsos pelas bombas de efluxo são macrolídeos, tetraciclina e quinolonas. Em todos os processos metabólicos há geralmente um elevado grau de especificidade para o transporte de proteínas e enzimas, embora as bombas de efluxo multidroga reconheçam uma ampla variedade de substratos estruturalmente e quimicamente diferentes (VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007).

Os sistemas de efluxo multidroga foram agrupados em seis famílias: família *ATP binding cassette* (ABC), família *major facilitator superfamily* (MFS), família *resistance-nodulation-cell division* (RND), família *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE), família *small multidrug resistance* (SMR) e a superfamília *drug/metabolite transporter* (DMT) (VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; LIN et al., 2015).

As bombas de efluxo do tipo ABC são transportadores multidroga dependentes de ATP, pois o utilizam como fonte de energia para expelir os agentes antimicrobianos para fora da célula. Os membros desta família estão raramente envolvidos na aquisição de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas. Os outros tipos de bombas de efluxo são dependentes da força motiva de prótons (antiporte), pois a expulsão antimicrobiana é realizada

utilizando a força motriz de prótons como força motriz de efluxo. As principais bombas de efluxo envolvidas na multidroga resistência pertencem a este grupo de exportadores dependentes de força motiva de prótons, sendo a família RND o grupo mais importante, bem como as famílias MFS e SMR (MAGNET et al., 2001; POOLE, 2002).

Em *A. baumannii*, a resistência aos antimicrobianos mediada por bombas de efluxo está geralmente associada com a família MFS e RND. Utilizando uma abordagem genômica comparativa, Fournier e colaboradores (2006) tentaram identificar todos os genes de resistência presentes na cepa AYE multidroga resistente de *A. baumannii*, que foi responsável por um surto epidêmico na França. A maioria dos genes de resistência encontrados nesta cepa foram adquiridos a partir de outras bactérias, tais como *Pseudomonas*, *Salmonella* ou *E. coli* e concentraram-se em uma região ou “ilha” de 86 kb. Esta “ilha de resistência” (AbaR1) continha 45 genes que poderiam estar associados com a resistência aos antimicrobianos, metais pesados e antissépticos. Fora desta “ilha”, 46 ORFs (*open reading frames*) foram supostamente associados à resistência aos antimicrobianos, dos quais 32 ORFs foram associados com a família RND, sete com a família MFS, dois com a família MATE e um com a família SMR. Além disso, um gene foi associado com a superfamília ABC e outro com a superfamília DMT.

A família RND é constituída por uma proteína de membrana interna (bomba RND – transportador), ligada por uma proteína de fusão maior (MFP) e um fator de membrana externa (OMF) que juntos são capazes de expulsar uma grande variedade de substratos. Esta é a família de bombas de efluxo mais clinicamente relevante, pois conferem multidroga resistência a bactérias Gram-negativas (COYNE et al., 2011; LIN et al., 2015).

Três sistemas de efluxo da família RND, AdeABC, AdeIJK e AdeFGH foram reportados como causa de multidroga resistência em *A. baumannii* (RUMBO et al., 2013).

O sistema de efluxo AdeABC (*Ade* – *Acinetobacter drug efflux*) foi o primeiro da família RND a ser caracterizados em isolados de *A. baumannii*. O operon *adeABC* codifica o *AdeA* (MFP), *AdeB* (transportador) e *AdeC* (OMF). Este operon não é expresso naturalmente em isolados de *A. baumannii* e o fenótipo MDR é devido à sua superexpressão. A expressão do *adeABC* é regulada por dois componentes do sistema de regulação (*two-component system*) AdeR-AdeS, codificado pelo operon *adeRS* que está localizado na região *upstream* do *adeABC* e é transcrito na direção oposta (MAGNET et al., 2001; MARCHAND et al., 2004; COYNE et al., 2011). AdeS corresponde a uma proteína quinase, a qual, em respostas a estímulos externos (como a presença de um agente antimicrobiano), se autofosforila em um resíduo de histidina. Em seguida, transfere o grupo fosfato a um resíduo de asparagina na proteína AdeR que, uma vez fosforilada, promove a transcrição da bomba AdeABC (OPAZO et al., 2009). Mutações

neste sistema regulador e a presença da sequência de inserção *ISAbal* podem levar a uma superexpressão do operon *adeABC* (RUMBO et al., 2013).

Experimentos de inativação com um isolado clínico indicou que a superexpressão do sistema de efluxo AdeABC confere resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, macrólidos, cloranfenicol e trimetoprim. Adicionalmente, diminuição da sensibilidade a netilmicina tem sido correlacionada com a superexpressão desse sistema em uma vasta coleção de isolados clínicos. Os β -lactâmicos mais afetados são cefepime, cefpiroma e cefotaxima, tendo pouco impacto sobre outros membros desta classe de antimicrobianos. O papel do AdeABC na resistência aos carbapenêmicos é controverso, pois os testes de sensibilidade com ou sem o uso de inibidores de bombas de efluxo (EPI) não mostram diferença na atividade dos carbapenêmicos (COYNE et al., 2011).

O sistema de efluxo AdeIJK, codificado pelo operon *adeIJK*, é o segundo sistema da família RND descrito em isolados de *A. baumannii* e é específico para esta espécie. Este sistema de efluxo contribui na resistência intrínseca aos β -lactâmicos, como a ticarcilina, cefalosporina e aztreonam, fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol e novobiocina. Já os aminoglicosídeos não são utilizados com substrato nesta bomba de efluxo. A regulação do operon *adeIJK* parece estar relacionada com o gene *adeN* (COYNE et al., 2011; RUMBO et al., 2013).

O terceiro sistema de efluxo da família RND descrito em isolados de *A. baumannii* foi o AdeFGH, que é codificado pelo operon *adeFGH* e, quando superexpresso, confere resistência a vários antimicrobianos. Acredita-se que este sistema seja regulado por um ORF, cujo regulador é o *adeL*, encontrado na região *upstream* do operon *adeFGH* e é transcrito na direção oposta. Quando ocorrem mutações no gene *adeL*, uma superexpressão deste sistema é observada e induz resistência a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e clindamicina, e redução da susceptibilidade a tetraciclinas, tigeciclina e sulfametoxazol, sem afetar β -lactâmicos e aminoglicosídeos (COYNE et al., 2011; RUMBO et al., 2013).

A Figura 2 a seguir ilustra os operons que codificam os sistemas de efluxo da família RND descritos em isolados de *A. baumannii*:

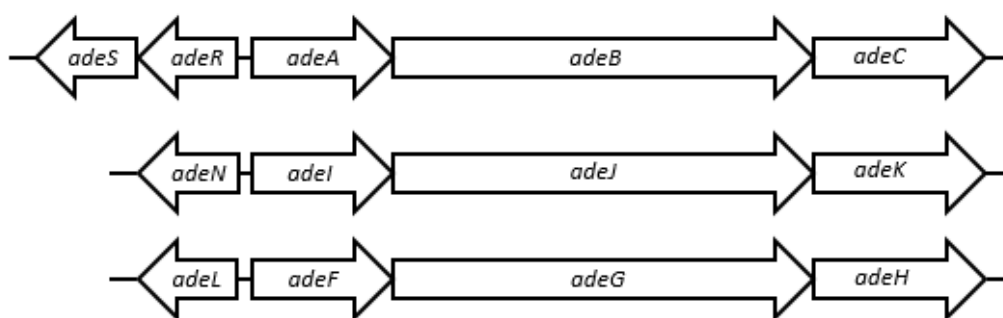


Figura 2. Representação esquemática dos operons que codificam os sistemas de efluxo RND em *A. baumannii*. Setas abertas representam sequências codificantes e indicam o sentido da transcrição. (Fonte: o autor)

Outros três tipos de sistemas de efluxo foram descritos em *A. baumannii*: CraA – uma bomba da família MFS, que confere resistência intrínseca ao cloranfenicol; AbeM – uma bomba da família MATE, que expulsa vários antimicrobianos e biocidas; e AmvA – uma bomba da MFS, que confere resistência à detergentes, desinfetantes, corantes e eritromicina. A superexpressão do sistema de efluxo AmvA tem sido associada a um aumento na resistência a drogas em isolados clínicos de *A. baumannii* (RUMBO et al., 2013).

Vários sistemas de efluxo de tetraciclina foram reportados em *A. baumannii*. Estes sistemas fazem parte da família MFS, sendo os mais prevalentes o TetA – que está relacionado à resistência à tetraciclina em isolados clínicos, e TetB – que está envolvido na resistência à tetraciclina, doxiciclina e minociclina (RUMBO et al., 2013).

2.5 Sequenciamento genômico

A tecnologia do sequenciamento genômico de última geração (NGS – “*next generation sequencing*”) é uma ferramenta que possibilita uma melhor análise dos mecanismos de resistência, patogenicidade e evolução dos micro-organismos. Esta tecnologia provou ser útil para compreender completamente as características básicas de um patógeno, conseguir traçar estratégias de controle de infecção e direcionar o tratamento para que ele seja mais eficaz (ZHU et al., 2013).

Vários estudos estão utilizando o NGS para correlacionar geneticamente isolados clínicos bacterianos para várias finalidades, como: (1) identificação de espécies, (2) estrutura populacional e (3) disseminação global de bactérias. Outra possibilidade de aplicação dessa técnica diz respeito ao perfil genético e epidemiológico das espécies bacterianas, bem como a transmissão de genes entre elas e a identificação de surtos (FITZPATRICK; OZER; HAUSER, 2016).

Para compreender melhor a recombinação genética relacionada a aquisição de elementos de resistência durante uma infecção, Zhu e colaboradores (2013) realizaram uma análise completa do genoma de três cepas de *A. baumannii* multidroga resistente utilizando a tecnologia de NGS. Os resultados demonstraram uma organização genômica extensa e dinâmica, que facilitam a aquisição de genes de resistência a múltiplas drogas em seu genoma.

Liu e colaboradores (2014) sequenciaram oito isolados de *A. baumannii* (sete isolados multidroga resistentes e um isolado sensível), com a finalidade de compreender melhor a variação genética e os mecanismos de resistências aos antibióticos destas bactérias ao nível genômico. Após análises, encontraram uma grande variação entre os genomas sequenciados, incluindo uma nova ilha genômica de resistência a metais no isolado sensível, na mesma posição onde deveria existir uma ilha genômica de resistência a antibióticos. Tais resultados confirmaram mais uma vez grande variabilidade genética que existe entre isolados de *Acinetobacter*. Esta plasticidade genômica contribui favoravelmente para o desenvolvimento de multidroga resistência em isolados clínicos.

Isolados de *Acinetobacter* têm sido sequenciados genomicamente por diversos autores e as comparações entre os genomas têm sido realizadas: Sahl e colaboradores (2011), Vallenet e colaboradores (2008), Farrugia e colaboradores (2013), Fitzpatrick e colaboradores (2016). Estes estudos corroboram com os citados anteriormente e ajudam a compreender a grande diversidade genética desta bactéria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar determinantes genéticos de virulência e resistência em isolado de *Acinetobacter nosocomialis* sensível, além de determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a ocorrência dos sistemas de efluxo e seus reguladores através de sequenciamento genômico dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes, provenientes de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento do câncer na cidade de Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Acinetobacter nosocomialis* frente aos antimicrobianos;
- Determinar o valor da concentração inibitória mínima (CIM) para diferentes classes de agentes antimicrobianos;
- Pesquisar determinantes genéticos de virulência e resistência em um isolado sensível de *Acinetobacter nosocomialis*.
- Pesquisar a ocorrência de genes de sistemas de efluxo nos isolados de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes;
- Pesquisar os sistemas reguladores associados aos sistemas de efluxo.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo descritivo de base laboratorial e genômica que visa determinar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), a ocorrência dos sistemas de efluxo e mutações em seus reguladores através de sequenciamento genômico dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento do câncer na cidade de Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014.

4.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado em um hospital público, referência no tratamento de pacientes com câncer, localizado em Recife, Pernambuco. O referido hospital tem a capacidade para atender 55% de todos os pacientes oncológicos do estado de Pernambuco, contando com 274 leitos, 9 enfermarias, 22 leitos de urgência, 16 leitos de UTI, 14 leitos de pediatria, além de 8 salas cirúrgicas. Possui serviço de urgência 24h, quimioterapia, radioterapia, radiologia, odontologia e próteses reabilitadoras, além de serviços de oncologia médica, cirúrgica, psicologia, fisioterapia e fonoaudiologia.

4.3 População Alvo

Isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de amostras biológicas de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento de pacientes com câncer.

4.4 Isolados bacterianos

Os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. coletados em Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014 foram provenientes de pacientes internados em um hospital público de referência no tratamento do câncer. Os mesmos foram fornecidos pelos profissionais do laboratório de análises clínicas terceirizado do referido hospital, após realização de identificação bioquímica (manual e automatizada) e do perfil de susceptibilidade antimicrobiano.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram inoculados em tubos rosqueados contendo Ágar Casoy inclinado e transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical/UFPE, para serem processados. Após incubação em estufa a 37°C/24 horas, os isolados foram semeados em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para avaliar as características microbiológicas da espécie bacteriana em questão.

Estes isolados bacterianos foram mantidos em estoque congelado, em caldo BHI adicionado de glicerol (20%), a -20°C e em Ágar Nutriente inclinado a 4°C. Para as análises posteriores, alíquotas deste estoque foram cultivadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em estufa a 37°C/24 - 48 horas.

4.5 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a identificação dos isolados de *Acinetobacter* spp. foi realizado o teste de susceptibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo critérios do CLSI (2015). A determinação da CIM foi feita para os seguintes antimicrobianos: ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, amicacina, gentamicina e polimixina B. Como controle de qualidade para o teste foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.6 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, como mostra o esquema abaixo:

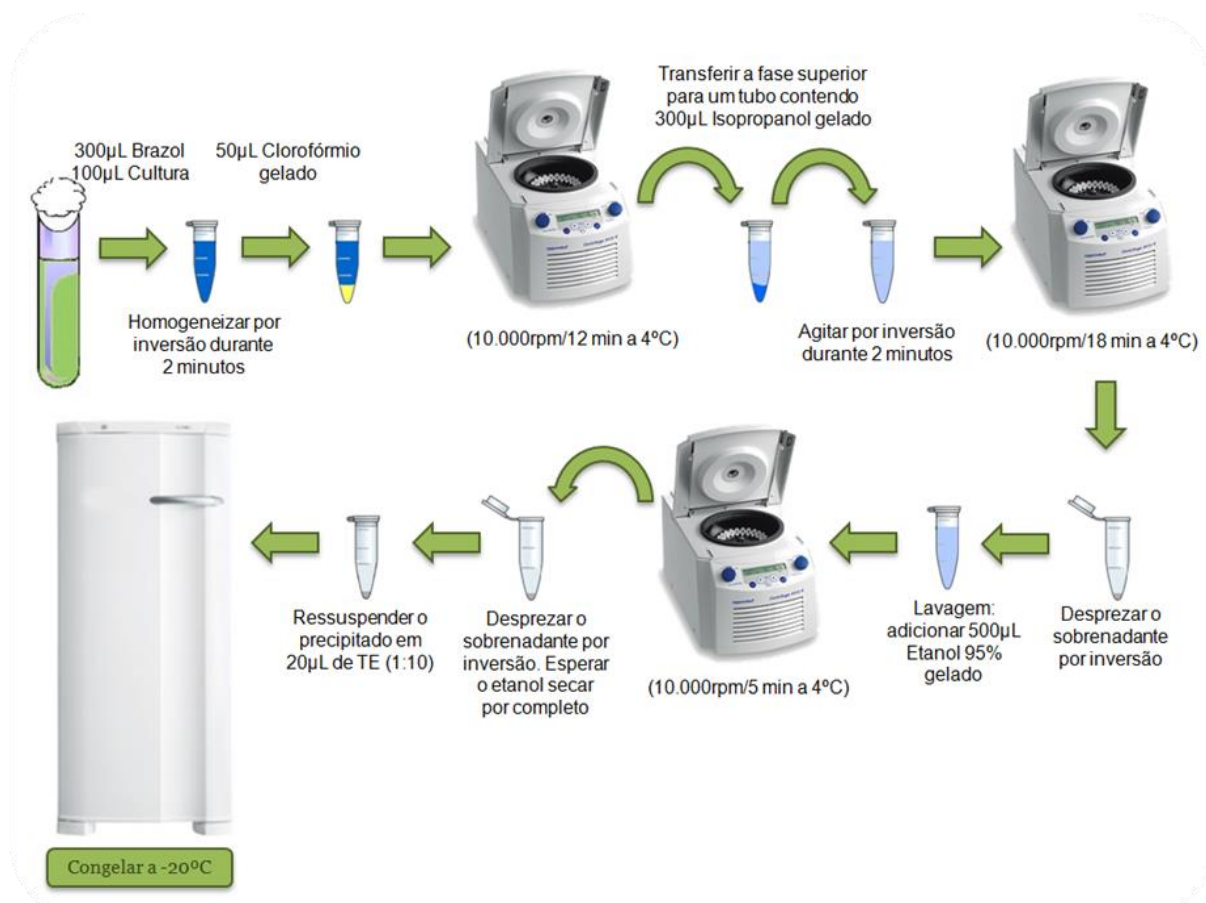


Figura 3. Esquema representativo da técnica de extração de DNA utilizando o Kit Brazol (JÁCOME, 2011)

Após a extração do DNA bacteriano foi realizada a sua quantificação no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), espectrofotômetro cuja faixa de comprimento de onda é completa (190 a 840nm) e garante uma alta precisão e reprodutibilidade.

4.7 Preparação de bibliotecas de DNA e sequenciamento genômico

Com os DNAs extraídos e quantificados, deu-se início à preparação e montagem das bibliotecas de DNA utilizando o kit Nextera XT (Illumina), sendo esta etapa realizada no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM – Fiocruz – Recife – PE. A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) através do Kit Library Quantification (Illumina) e o equipamento 7500 da Applied BioSystems. O sequenciamento genômico foi realizado utilizando o sistema de bibliotecas *pair-end* e o equipamento MiSeq (Illumina) com o cartucho MiSeq Kit V3 de 600 ciclos (CABRAL, 2016).

4.8 Montagem e anotação dos genomas

Inicialmente foi analisada a qualidade dos fragmentos gerados, utilizando a ferramenta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para a limpeza de informações com baixa qualidade e remoção de interferentes foi utilizado os parâmetros da ferramenta Trimmomatic v 0.32. Posteriormente a esta limpeza, foi realizada a montagem dos contigs utilizando os programas velveth e velvetg, configurados com o auxílio da ferramenta VelvetOptimiser (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). Para a anotação e predição de proteínas foram utilizadas as ferramentas Prokka e VFDB (*Virulence Factors Data Base*). Por fim, o alinhamento e ordenação dos contigs foi feito utilizando o programa Mauve. Todas as informações relativas à montagem, predição e anotação gênica foram armazenadas em um banco de dados relacional utilizando como ferramenta de gerenciamento o MySQL (CABRAL, 2016).

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Detecção genética de sistemas efluxo multidroga em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes com câncer, internados em Recife, Pernambuco, Brasil.

Introdução

Ao longo dos anos, *Acinetobacter baumannii* tornou-se um dos mais importantes patógenos oportunistas causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Este tipo de infecção representa uma ameaça significativa para pacientes imunocomprometidos, particularmente em pacientes com câncer, com ou sem neutropenia, devido aos efeitos que o tratamento quimioterápico causa ao seu sistema imunológico (PRASHANTH; BADRINATH, 2006; NWADIKE et al., 2014; AL-OTAIBI et al., 2016; JÁCOME et al., 2016).

Uma característica importante das espécies de *Acinetobacter* é que estas possuem propensão a desenvolver resistência bacteriana rapidamente, estando associada à pressão seletiva dos agentes antimicrobianos utilizados. Tal resistência está disseminada a nível mundial, dificultando o tratamento de infecções causadas por bactérias deste gênero (FALAGAS et al., 2007; NWADIKE et al., 2014).

Acredita-se que o desenvolvimento da multidroga resistência em *A. baumannii* deve-se à expressão de mecanismos como: (1) produção de enzimas que inativam os antimicrobianos, (2) perda de porinas; (3) e a hiperexpressão dos sistemas de efluxo. Tais mecanismos, quando expressos conjuntamente, levam a um aumento considerável das taxas de resistência aos antimicrobianos (MARAGAKIS; PERL, 2008; PELEG et al., 2008; DERIS et al., 2009; KUMAR et al., 2012).

Dentre os sistemas de efluxo descritos em espécies de *A. baumannii*, os pertencentes à família RND (*resistance-nodulation-cell division*) e MFS (*major facilitator superfamily*) são os mais frequentes, não excluindo a contribuição das demais famílias de sistemas de efluxo no cenário da multirresistência (FOURNIER et al., 2006; VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; COYNE et al., 2011; RUMBO et al., 2013; LIN et al., 2015).

Estudos que avaliem o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de mecanismos de resistência podem orientar medidas de prevenção e controle de IRAS. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *A. baumannii* e detectar, por sequenciamento genômico, os sistemas de efluxo e mecanismos de resistência associados em isolados de *A. baumannii*, provenientes de pacientes

oncológicos internados em um hospital público de referência para o tratamento do câncer, situado em Recife, Pernambuco, Brasil.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos

As amostras biológicas foram coletadas por profissionais de um hospital público especializado na assistência a pacientes com câncer na cidade de Recife, Pernambuco, durante o ano de 2014. Estas amostras foram encaminhadas ao laboratório vinculado ao hospital para ser realizado o isolamento, identificação bioquímica e determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos.

Os isolados de *A. baumannii* multidroga resistentes foram gentilmente cedidos pelo referido laboratório, semeados em tubos rosqueados contendo Ágar Casoy inclinado e transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical/UFPE, onde foram processados. Todos os isolados foram inoculados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados em estufa a 37°C/24 horas. Posteriormente, foram semeados em Ágar eosina azul de metileno (EMB) para avaliar as características microbiológicas da bactéria em questão e mantidos em estoque congelado, em caldo BHI adicionado de glicerol 20%, a -20°C. Para confirmação da espécie bacteriana foi realizada a identificação por meio da técnica de MALDI-TOF, em colaboração com o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ/PE.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a avaliação da pureza dos isolados de *A. baumannii*, foi realizado teste de susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os padrões definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para bactérias do gênero *Acinetobacter*, utilizando os seguintes antimicrobianos: ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, amicacina, gentamicina e polimixina B. A leitura do teste determina o valor da concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano em microgramas por mililitro (µg/mL) (CLSI, 2015).

Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração foi realizada a quantificação dos DNAs bacterianos, sendo armazenados posteriormente a -20°C.

Preparação de bibliotecas de DNA e sequenciamento genômico

A preparação e montagem das bibliotecas de DNA foi realizada utilizando o kit Nextera XT (Illumina). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do Kit Library Quantification (Illumina) e o equipamento 7500 da Applied BioSystems. O sequenciamento genômico foi realizado utilizando o sistema de bibliotecas pair-end e o equipamento MiSeq (Illumina) com o cartucho MiSeq Kit V3 de 600 ciclos.

Montagem e anotação dos genomas

Inicialmente foi analisada a qualidade dos fragmentos gerados, utilizando a ferramenta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para a limpeza de informações com baixa qualidade e remoção de interferentes foi utilizado os parâmetros da ferramenta Trimmomatic v 0.32. Posteriormente a esta limpeza, foi realizada a montagem dos contigs utilizando os programas velveth e velvetg, configurados com o auxílio da ferramenta VelvetOptimiser (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). Para a anotação e predição de proteínas foi utilizada a ferramenta Prokka. Por fim, o alinhamento e ordenação dos contigs foi feito utilizando o programa Mauve. Todas as informações relativas à montagem, predição e anotação gênica foram armazenadas em um banco de dados relacional utilizando como ferramenta de gerenciamento o MySQL.

Resultados

Caracterização dos isolados, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e detecção genética dos sistemas de efluxo

Os cinco isolados de *A. baumannii* selecionados pelo seu perfil de resistência foram provenientes das seguintes amostras biológicas: sangue (n=1), secreção traqueal (n=2), ponta de cateter (n=1) e líquido cavitário (n=1). Quanto ao setor de internamento, quatro dos cinco pacientes estavam internados na unidade de terapia intensiva (UTI) e apenas um estava internado no setor de hematologia do hospital (tabela 1).

Em relação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana, este foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo que revelou o fenótipo de multidroga resistência dos isolados de *A. baumannii* testados. Todos os isolados foram resistentes à ceftriaxona (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$), ceftazidima (CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), imipenem (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), meropenem (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) e ciprofloxacina (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). A resistência ao cefepime (CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) foi observada em quatro isolados, à amicacina (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) e gentamicina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) em três

isolados. Os antimicrobianos levofloxacin, polimixina B e ampicilina/sulbactam apresentaram maior taxa de sensibilidade nos isolados testados (tabelas 1 e 2).

Considerando as anotações obtidas pelo sequenciamento genômico foi possível detectar, em todos os isolados, a presença de vários genes de sistemas de efluxo pertencentes as famílias MATE, RND e MFS (tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos isolados de *Acinetobacter baumannii* quanto ao sítio e setor de isolamento, perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de sistemas de efluxo multidroga

Isolado bacteriano	Sítio de isolamento	Setor do hospital	Perfil de susceptibilidade	Genes de sistemas de efluxo
Acb_43	Sangue	UTI	Sensível (APS, LEV, AMI, GEN, POL B); Intermediário (CPM); Resistente (CRO, CAZ, IPM, MPM, CIP)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_44	Secreção traqueal	UTI	Sensível (APS, LEV, POL B); Resistente (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeR</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_45	Ponta de cateter	Hematologia	Sensível (APS, POL B); Intermediário (LEV); Resistente (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeC</i> , <i>adeR</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_46	Secreção traqueal	UTI	Sensível (APS, LEV, AMI, GEN, POL B); Resistente (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeR</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_47	Líquido cavitário	UTI	Sensível (APS, LEV, POL B); Resistente (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).

Legenda: Acb = *Acinetobacter baumannii*; UTI = unidade de terapia intensiva; APS = ampicilina/sulbactam; CRO = ceftriaxona.; CAZ = ceftazidima; CPM = cefepime; IPM = imipenem; MPM = meropenem; CIP = ciprofloxacina; LEV = levofloxacina; AMI = amicacina; GEN = gentamicina; POL B = polimixina B; MATE = família *multidrug and toxic compounds extrusion*; RND = família *resistance-nodulation-cell division*; MFS = *major facilitator superfamily*.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* por microdiluição em caldo

Antimicrobiano	Acb_43	Acb_44	Acb_45	Acb_46	Acb_47
Ampicilina/Sulbactam	S ($\leq 1/0,5$)	S (1/0,5)	S (4/2)	S (1/0,5)	S ($\leq 1/0,5$)
Ceftriaxona	R (>128)	R (>128)	R (>128)	R (>128)	R (>128)
Ceftazidima	R (128)	R (>128)	R (>128)	R (128)	R (>128)
Cefepime	I (16)	R (32)	R (128)	R (32)	R (32)
Imipenem	R (>64)	R (64)	R (64)	R (32)	R (64)
Meropenem	R (>64)	R (>64)	R (>64)	R (>64)	R (>64)
Ciprofloxacina	R (>32)	R (>32)	R (>32)	R (>32)	R (>32)
Levofloxacina	S (2)	S (2)	I (4)	S (2)	S (2)
Amicacina	S (≤ 2)	R (128)	R (32)	S (4)	R (64)
Gentamicina	S (2)	R (>64)	R (>64)	S (2)	R (>64)
Polimixina B	S (2)	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)

Legenda: Acb = *Acinetobacter baumannii*; S = sensível; I = intermediário; R = resistente. OBS: Os valores entre parênteses referem-se ao valor da CIM (concentração inibitória mínima) em µg/mL (microgramas por mililitro).

Discussão

Neste estudo, investigamos geneticamente cinco isolados clínicos de *A. baumannii* com perfil de resistência a vários antibióticos. Este patógeno é um dos principais causadores de infecções em pacientes internados, com ou sem câncer, nos últimos anos. A persistência de *A. baumannii* no ambiente hospitalar é atribuída ao seu perfil de multidroga resistência (PONGAS et al., 2012; CHAUDHARY; PAYASI, 2014; JÁCOME et al., 2016).

Estudos recentes demonstraram que a frequência de isolados multidroga resistentes é bastante elevada. Jácome e colaboradores (2016) analisando 169 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* spp. provenientes de pacientes internados com neoplasias sólidas em Recife observaram que a ocorrência de multidroga resistência foi de 77,8% para *Acinetobacter* spp., 64,0% para *Klebsiella* spp. e 58,6% para *P. aeruginosa*. Este mesmo estudo demonstrou que *Acinetobacter* spp. foi o patógeno com maior porcentagem de resistência, o que foi observado nos isolados utilizados nesta pesquisa, pois todos apresentaram uma elevada taxa de resistência aos antimicrobianos utilizados. Os isolados Acb_43 e Acb_46 apresentaram resistência a β -lactâmicos, carbapenêmicos e fluorquinolonas.

Já os isolados Acb_44, Acb_45 e Acb_47 apresentaram resistência aos aminoglicosídeos, além das classes anteriormente citadas.

Dados que corroboram com Jácome e colaboradores (2016) foram os obtidos por Hinrichsen e colaboradores (2014) que, analisando 137 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes internados em dois hospitais privados terciários em Recife, observaram uma elevada taxa de multidroga resistência: 86,0% para o hospital A e 53,0% para o hospital B. Tais resultados demonstram que em Recife, existe uma alta frequência de detecção de *Acinetobacter* spp. multirresistente em ambiente hospitalar, seja ele público ou privado.

Adicionalmente, estudos realizados em hospitais na Malásia e Sérvia também encontraram taxas de resistência antimicrobiana elevadas em bactérias do gênero *Acinetobacter*, 77,2% e 98,7%, respectivamente (BIGLARI et al., 2016; DJURIC et al., 2016). Desta forma percebe-se que, nos últimos anos, a ocorrência de *A. baumannii* multidroga resistente em hospitais tem sido constante não somente em Recife, Pernambuco, Brasil, mas em hospitais espalhados pelo mundo.

O primeiro sistema de efluxo encontrado nos isolados do nosso estudo foi o AbeM. Esta bomba pertence à família MATE que tem a capacidade de expulsar para fora da célula bacteriana antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluorquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e compostos como brometo de etídio e corantes (COYNE et al., 2011).

As elevadas taxas de resistência a fluorquinolonas e aminoglicosídeos observadas nos espécimes bacterianos em nosso estudo podem ser consequência da expressão do sistema de efluxo AbeM e/ou a outros mecanismos de resistência associados, como mutações nos genes *gyrA* e *parC* (QRDRs), e a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ambos detectados em nossos isolados (dados não publicados).

Inicialmente descrito como uma proteína hipotética, Su e colaboradores (2005) descreveram a potencial função do sistema AbeM. Comparando a sequência desta proteína utilizando o BLAST foi possível encontrar um percentual de identidade e similaridade com proteínas de efluxo de vários micro-organismos, como *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Haemophilus influenzae*. Os autores concluíram que era provável que a proteína AbeM fosse um membro da família MATE de sistemas de efluxo, responsável por expulsar da célula bacteriana múltiplos antimicrobianos.

Em contrapartida, Coyne e colaboradores (2011) afirmam que a relevância deste sistemas de efluxo para a resistência a múltiplos antimicrobianos em *A. baumannii* permanece hipotética, visto que o gene AbeM foi encontrado em vários isolados clínicos sem qualquer

correlação com a resistência aos antibióticos mesmo em isolados que superexpressam este gene, sugerindo um fraco impacto desse sistema.

Os sistemas de efluxo da família RND são encontrados com maior frequência em isolados clínicos de *A. baumannii* e podem, quando expressos, contribuir para o fenótipo de resistência em isolados clínicos. Dados obtidos neste estudo mostram que os sistemas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK são frequentes. A presença destes três sistemas de efluxo nos cinco isolados de *A. baumannii* estudados pode justificar o perfil de multidroga resistência observado, uma vez que os agentes antimicrobianos testados são substratos específicos para estes sistemas de efluxo.

Adicionalmente, em quatro dos cinco isolados pesquisados (Acb_43, Acb_44, Acb_46 e Acb_47) houve detecção de uma variante da carbapenemase OXA-143, a OXA-253, dados que foram recentemente publicados por De Sá Cavalcanti e colaboradores (2017). É possível analisar, na tabela 2, os valores elevados da CIM para os antibióticos nos isolados que possuem simultaneamente os sistemas de efluxo e a enzima OXA-253. Enzimas do tipo carbapenemase quando associadas a sistemas de efluxo ativos contribuem de forma significativa para o aumento das taxas de resistência a múltiplos antibióticos em isolados clínicos de *A. baumannii*, como é possível observar em estudos publicados por Hu e colaboradores (2007) e Lee e colaboradores (2010).

Para provar a capacidade desses sistemas em causar fenótipos de multirresistência, vários estudos foram realizados comparando isolados de *A. baumannii* que possuíam os sistemas de efluxo com mutantes dos mesmos isolados apresentando deleção intencional destes sistemas. Os resultados obtidos foram semelhantes para as bombas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK, onde os isolados que apresentavam os sistemas de efluxo acima citados apresentavam maiores valores de MIC para os antimicrobianos quando comparado aos isolados mutantes, que apresentavam uma diminuição nos valores de CIM (MAGNET et al., 2001; DAMIER-PIOLLE et al., 2008; COYNE et al., 2010).

O sistema adeT foi detectado em quatro dos cinco isolados testados nesse estudo pesquisados (Acb_43, Acb_44, Acb_46 e Acb_47). A função deste sistema ainda não é conhecida por completo, pois se levarmos em consideração os dados disponíveis na literatura, apenas um estudo foi realizado por Srinivasan e colaboradores (2011). Este estudo teve como base a clonagem molecular e caracterização funcional de duas proteínas de fusão de membrana (MFP) – adeT1 e adeT2 – que, possivelmente, estariam envolvidas na resistência antimicrobiana em isolados de *A. baumannii*. As análises feitas constataram um acúmulo de ciprofloxacina na célula bacteriana, evidenciando uma diminuição do efluxo no isolado mutante

que possuía a deleção do gene *adeT1* quando comparado ao isolado original. A presença dos genes *adeT1* e *adeT2* aumentaram os valores de MIC para ciprofloxacina. Quando foram utilizados EPIs (“*efflux pump inhibitors*”), a acumulação de ciprofloxacina no interior das células bacterianas aumentou, evidenciando que esta MFP participa do efluxo ativo de antimicrobianos.

Por fim, o último sistema de efluxo detectado em todos os isolados utilizados neste estudo foi o *amvA* pertencente à família MFS. Tal sistema tem a capacidade de expulsar da célula bacteriana fluorquinolonas, eritromicina e novobiocina, o que pode justificar os valores elevados da CIM para ciprofloxacina nos isolados de *A. baumannii* utilizados neste estudo. Para avaliar a capacidade deste sistema em expulsar antimicrobianos, Rajamohan e colaboradores (2010) utilizaram um isolado clínico de *A. baumannii* portador do gene *amvA* para criar mutantes sem a presença deste gene. Testes de sensibilidade foram feitos com os isolados (original e mutante) onde foi possível observar um aumento nos valores das MICs para ciprofloxacina, eritromicina, norfloxacina e novobiocina no isolado que possuía o gene *amvA* quando comparado com o isolado mutante que apresentava a deleção deste gene, ficando claro o papel de mediação do gene *amvA* na resistência microbiana.

Diante dos dados obtidos e analisados durante esta pesquisa, concluímos que os sistemas de efluxo podem contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *A. baumannii*, não esquecendo de destacar que outros mecanismos podem atuar simultaneamente com estes sistemas – a exemplo de enzimas beta-lactamases, carbapenemases, alterações de permeabilidade ou perda de porinas e mutações em regiões determinantes de resistência à quinolonas (QRDR) – elevando ainda mais as taxas de resistência nestes isolados, facilitando o estabelecimento da infecção e dificultando o tratamento dos pacientes.

Referências

PRASHANTH, K.; BADRINATH, S. Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol.24(1), p.39-44, 2006.

NWADIKE, V.U.; OJIDE, C.K.; KALU, E.I. Multidrug resistant *Acinetobacter* infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a Nigerian Tertiary Hospital ICU. **Afr. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2014.

AL-OTAIBI, F.E.; BUKHARI, E.E.; BADR, M.; ALRABIAA, A.A. Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy. **Saudi Med J.**, vol. 37(9), p. 979-84, 2016.

JÁCOME, P.R.; ALVES, L.R.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T.; SILVA, M.J.; LIMA, J.L.; ARAÚJO, P.S.; LOPES, A.C.; MACIEL, M.A. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **J Med Microbiol.**, vol. 65(7), p. 658-65, 2016.

FALAGAS, M.E.; MOURTZOUKOU, E.G.; POLEMIS, M.; VATOPOULOS, A.C.; Greek System for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 13, p. 816-819, 2007.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, vol.46, p.1254-1263, 2008.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, vol.21(3), p.538-582, 2008.

DERIS, Z.Z.; HARUN, A.; OMAR, M.; JOHARI, M.D.R. The prevalence and risk factors of nosocomial *Acinetobacter* blood stream infections in tertiary teaching hospital in north-eastern Malaysia. **Tropical Biomedicine**, vol.26(2), p.123–129, 2009.

KUMAR, S.H.; DE, A.S.; BAVEJA, S.M.; GORE, M.A. Prevalence and Risk Factors of Metallo β -lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in Burns and Surgical Wards in a Tertiary Care Hospital. **J. Lab. Physicians.**, vol. 4(1), p. 39-42, 2012.

FOURNIER, P.E.; VALLENET, D.; BARBE, V.; AUDIC, S.; OGATA, H.; POIREL, L.; RICHET, H.; ROBERT, C.; MANGENOT, S.; ABERGEL, C.; NORDMANN, P.; WEISSENBAACH, J.; RAOULT, D.; CLAVERIE, J.M. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genet.**, vol.2, p.62-72, 2006.

VILA, J.; MARTI, S.; SANCHEZ-CESPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.59(6), p.1210-1215, 2007.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55(3), p.947-953, 2011.

RUMBO, C.; GATO, E.; LÓPEZ, M.; RUIZ DE ALEGRÍA, C.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; VILA, J.; PACHÓN, J.; CISNEROS, J.M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A.; BOU, G.; TOMÁS, M.; SPANISH GROUP OF NOSOCOMIAL INFECTIONS AND MECHANISMS OF ACTION AND RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS (GEIH-GEMARA); SPANISH SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (SEIMC); SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES(REIPI). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, vol. 57(11), p. 5247-57, 2013.

LIN, M-F.; LIN, Y-Y.; TU, C-C.; LAN, C-Y. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2015.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (January 2015). **CLSI document M100-S25**, v.35, n.3, 2015.

PONGAS, G.; HAMILOS, G.; ROLSTON, K.V.; KONTOYIANNIS, D.P. Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center (1998–2008): diverse and impactful. **Supportive Care in Cancer**. v.20, p. 261–265, 2012.

CHAUDHARY, M.; PAYASI, A. Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, s.1, p. S217-23, 2014.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; LIRA, C.; SANTOS-JUNIOR, B. J.; CRUZ, P. W. S. Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. **Rev Panam Infectol.**, v. 16, p. 174–179, 2014.

BIGLARI, S.; HANAFIAH, A.; MOHD-PUZI, S.; RAMLI, R.; RAHMAN, M.; LOPES, B.S. Antimicrobial resistance mechanisms and genetic diversity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a teaching hospital in Malaysia. **Microb Drug Resist.** 2016.

DJURIC, O.; JOVANOVIĆ, S.; STOSOVIC, B.; TOSIC, T.; JOVANOVIĆ, M.; MARKOVIC-DENIC, L. Antimicrobial resistance of selected invasive bacteria in a tertiary care center: results of a prospective surveillance study. **J Infect Dev Ctries.**, v. 10, n. 12, p. 1325-1331, 2016.

SU, X.Z.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4362-4, 2005.

HU, W.S.; YAO, S.M.; FUNG, C.P.; HSIEH, Y.P.; LIU, C.P.; LIN, J.F. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, n. 11, p. 3844-52, 2007.

LEE, Y.; YUM, J.H.; KIM, C.K.; YONG, D.; JEON, E.H.; JEONG, S.H.; AHN, J.Y.; LEE, K. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*_{OXA-66} gene. **Ann Clin Lab Sci.**, v. 40, n. 1, p. 43-8, 2010.

DE SÁ CAVALCANTI, F.L.; MENDES-MARQUES, C.L.; VASCONCELOS, C.R.D.S.; DE LIMA CAMPOS, T.; REZENDE, A.M.; XAVIER, D.E.; LEAL, N.C.; DE-MELO-NETO, O.P.; DE MORAIS, M.M.C.; LEAL-BALBINO, T.C. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, n. 1, 2017.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.45, p.3375-3380, 2001.

DAMIER-PIOLLE, L.; MAGNET, S.; BRÉMONT, S.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 557-562, 2008.

COYNE, S.; ROSENFELD, N.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 54, n. 10, p. 4389-93, 2010.

SRINIVASAN, V.B.; RAJAMOHAN, G.; PANCHOLI, P.; MARCON, M.; GEBREYES, W.A. Molecular cloning and functional characterization of two novel membrane fusion proteins in conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 3, p. 499-504, 2011.

RAJAMOHAN, G.; SRINIVASAN, V.B.; GEBREYES, W. A. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, n. 9, p. 1919-25, 2010.

5.2 Artigo 2: Ocorrência de determinantes genéticos de virulência e resistência em isolado clínico de *Acinetobacter nosocomialis* sensível aos antimicrobianos

Introdução

O gênero *Acinetobacter* compreende várias espécies de bactérias Gram-negativas, não fermentadoras de carboidratos, imóveis, aeróbias estritas, que possuem uma capacidade de adaptação a ambientes hostis frequentemente associada à habilidade em aderir e formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas. Tal capacidade contribui para que este micro-organismo possa sobreviver por períodos prolongados no ambiente hospitalar, potencializando sua capacidade de disseminação e, assim, possibilitando a ocorrência de infecções relacionada à assistência à saúde (IRAS) (WISPLINGHOFF et al., 2007; PELEG et al., 2008; DOUGHARI et al., 2011).

Outra característica importante deste gênero bacteriano é a de favorecer o desenvolvimento de resistência rapidamente, sendo frequentemente associada à pressão seletiva que os agentes antimicrobianos causam durante o tratamento da infecção e a consequente expressão de mecanismos genéticos de resistência, limitando assim as opções terapêuticas disponíveis (FALAGAS et al., 2007; NWADIKE et al., 2014).

As pesquisas de mecanismos genéticos de resistência como, produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, perda ou diminuição de porinas e expressão dos sistemas de efluxo multidroga, estão restritas na grande maioria das vezes a isolados multidroga resistentes de *Acinetobacter*, sendo os isolados sensíveis excluídos destas análises.

Diante da falta de pesquisas que analisem os determinantes de virulência e resistência em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. sensíveis, este estudo teve como objetivo a pesquisa dos mecanismos genéticos de virulência e resistência antimicrobiana em um isolado clínico de *A. nosocomialis* sensível fenotipicamente aos antimicrobianos proveniente de um paciente neutropênico.

Materiais e Métodos

Isolado bacteriano

O isolado de *A. nosocomialis* foi obtido de hemocultura de um paciente neutropênico internado em um hospital oncológico na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil.

Inicialmente, este isolado foi identificado por testes bioquímicos manuais e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão.

O isolado de *A. nosocomialis* foi transportado em tubo rosqueado contendo Ágar Casoy inclinado para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (Departamento de Medicina Tropical/UFPE), onde foi processado. A seguir, o isolado foi inoculado em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubado em estufa a 37°C/24 horas e mantido em estoque congelado, em caldo BHI adicionado de glicerol 20%, a -20°C. Para confirmação da espécie bacteriana foi realizada a identificação por meio da técnica de MALDI-TOF, em colaboração com o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ/PE.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a avaliação da pureza do isolado de *A. nosocomialis* foi realizado teste de susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os padrões definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para bactérias do gênero *Acinetobacter*, utilizando os seguintes antimicrobianos: ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, amicacina, gentamicina e polimixina B. A leitura do teste determina o valor da concentração inibitória mínima do agente antimicrobiano em microgramas por mililitro (µg/mL) (CLSI, 2015).

Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração foi realizada a quantificação do DNA bacteriano, sendo armazenado posteriormente a -20°C.

Preparação de bibliotecas de DNA e sequenciamento genômico

A preparação e montagem das bibliotecas de DNA foi realizada utilizando o kit Nextera XT (Illumina). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do Kit Library Quantification (Illumina) e o equipamento 7500 da Applied BioSystems. O sequenciamento genômico foi realizado utilizando o sistema de bibliotecas pair-end e o equipamento MiSeq (Illumina) com o cartucho MiSeq Kit V3 de 600 ciclos.

Montagem e anotação dos genomas

Inicialmente foi analisada a qualidade dos fragmentos gerados, utilizando a ferramenta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para a limpeza de

informações com baixa qualidade e remoção de interferentes foi utilizado os parâmetros da ferramenta Trimmomatic v 0.32. Posteriormente a esta limpeza, foi realizada a montagem dos contigs utilizando os programas velveth e velvetg, configurados com o auxílio da ferramenta VelvetOptimiser (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). Para a anotação e predição de proteínas e fatores de virulência foram utilizadas as ferramentas Prokka e VFDB, respectivamente. Por fim, o alinhamento e ordenação dos contigs foi feito utilizando o programa Mauve. Todas as informações relativas à montagem, predição e anotação gênica foram armazenadas em um banco de dados relacional utilizando como ferramenta de gerenciamento o MySQL.

Resultados

O teste de susceptibilidade fenotípica aos antimicrobianos revelou um perfil de completa sensibilidade (tabela 1).

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos do isolado clínico de *Acinetobacter nosocomialis* (Acb_11/48) por microdiluição em caldo.

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Interpretação
Ampicilina/Sulbactam	≤ 1/0,5	S
Ceftriaxona	8	S
Ceftazidima	≤ 1	S
Cefepime	≤ 1	S
Imipenem	≤ 0,5	S
Meropenem	≤ 0,5	S
Ciprofloxacina	≤ 0,25	S
Levofloxacina	≤ 0,25	S
Amicacina	≤ 2	S
Gentamicina	≤ 0,5	S
Polimixina B	2	S

Legenda: Acb = *Acinetobacter*; CIM = concentração inibitória mínima; S = sensível.

O sequenciamento genômico deste isolado clínico de *A. nosocomialis* sensível aos antimicrobianos revelou a presença de genes que codificam fatores de virulência e resistência (tabela 2).

Tabela 2: Genes de resistência e virulência presentes no isolado de *Acinetobacter nosocomialis* (Acb_11/48) determinados por sequenciamento genômico

Genes	Descrição
<u>Resistência</u>	
<i>bla</i> _{ADC-25}	Cefalosporinase derivada de <i>Acinetobacter</i>
<i>strA/strB</i>	Aminoglicosídeo fosfotransferase
<i>sul2</i>	Resistência a sulfonamidas
<i>AdeFGH</i>	Sistema de efluxo multidroga
<i>AdeIJK</i>	Sistema de efluxo multidroga
<u>Virulência</u>	
<i>pilQ/pilP/pilO/pilN</i>	Operon envolvido na biogênese de <i>pili</i> tipo IV
<i>pilT</i>	ATPase; proteínas de contração/motilidade (<i>pili</i> tipo IV)
<i>bfmR</i>	TCS; regula a formação de biofilme e participa da adesão celular
<i>bfmS</i>	TCS; regula a formação de biofilme e participa da adesão celular
<i>csuA</i>	Formação de biofilme
<i>csuB</i>	Formação de biofilme
<i>csuC</i>	Formação de biofilme
<i>csuD</i>	Formação de biofilme
<i>csuE</i>	Formação de biofilme

Legenda: Acb = *Acinetobacter*; TCS = *two-component system*

Discussão

Os mecanismos de patogenicidade em bactérias do gênero *Acinetobacter* ainda não estão totalmente esclarecidos. O que se sabe é que são necessários alguns fatores moleculares de virulência que incluem a proteína de membrana externa A, fosfolipase D, proteínas associadas à biofilme, *pilus* e sideróforos para que haja a colonização e infecção em humanos (HARDING et al., 2013). Em nosso estudo foram detectados genes que codificam ou contribuem para a formação de alguns dos fatores de virulência que são associados à colonização e estabelecimento do início da infecção a exemplo de genes associados à formação de *pilus* e biofilme.

Filamentos protéicos chamados *pili* estão envolvidos na ligação de espécies de *Acinetobacter* a superfícies bióticas ou abióticas e, conseqüentemente, na formação de biofilmes, conferindo a estas bactérias uma notável capacidade de sobreviver a condições

ambientais adversas (KRÖGER et al., 2017). A formação do *pilus* tipo IV é feita por monômeros de uma proteína chamada pilina, codificada pelo gene *pilA*. A montagem e desmontagem deste *pilus* é feita por duas ATPases, *pilB* e *pilT* (TAN et al., 2014). No isolado pesquisado, não foi possível detectar a presença do gene *pilA*, mas foi detectada a presença de um operon (*pilQPON*) ligado à síntese do *pilus* tipo IV e a presença de ATPase *pilT*. Alguns autores, como Harding e colaboradores (2013) afirmam que o papel do *pilus* tipo IV na adesão e formação de biofilme ainda é incerto, mesmo tendo observado que *Acinetobacter baumannii* é capaz de produzir *pilus* tipo 4 funcional. Os autores afirmam que se faz necessário realizar mais estudos que pudessem comprovar a sua participação na virulência em *Acinetobacter*.

Outros *pili* detectados em nosso estudo foi o sistema de montagem *csuA/ABCDE* regulado pelo *two-component system* (TCS) *bfmRS*, também detectado. Este sistema está envolvido na formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, permitindo que bactérias do gênero *Acinetobacter* possam sobreviver a condições desfavoráveis (KRÖGER et al., 2017). Se o sistema *csuA/BABCDE* é necessário para que haja a ligação ao tecido do hospedeiro ainda não está claro. Estudo realizado por De Breij e colaboradores (2009) demonstrou que o sistema *csuA/BABCDE* presente em *Acinetobacter baumannii* não estava envolvido na adesão a células epiteliais humanas. Entretanto, Liou e colaboradores (2014) observaram uma perda na capacidade de adesão de *Acinetobacter baumannii* as células epiteliais alveolares humanas, após a deleção do gene regulador deste sistema – *bfmS*.

Em relação aos mecanismos de resistência, a presença do gene *bla_{ADC-25}* foi observada em nosso isolado sensível. Esta cefalosporinase é considerada como um tipo de AmpC β -lactamase e confere resistência a penicilinas, cefamicinas e cefalosporinas, com exceção do cefepime. Os inibidores de β -lactamase parecem não ter ação sobre este tipo de enzimas, exceto o tazobactam que exibiu alguma atividade inibitória em *Morganella morganii* (PÉREZ et al., 2014). Liu e Liu (2015) determinaram a prevalência e resistência antimicrobiana associadas com β -lactamases tipo AmpC em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de um hospital terciário na China. De 134 isolados coletados, 96 produziram AmpC e ADC. Estes isolados positivos apresentaram um perfil de resistência aos β -lactâmicos de espectro estendido, que foi associado à alta incidência de enzimas AmpC e ADC. Outro estudo realizado por Zhao e colaboradores (2007), analisou a presença de *bla_{ADC}* em isolados de *A. baumannii* coletados de crianças internadas em uma clínica pediátrica durante o ano de 2006. Dos 28 isolados coletados, 17 possuíam o gene *bla_{ADC}* sendo que a maioria dos isolados não apresentava um fenótipo de multidroga resistência. O que se pode observar é que alguns isolados estudados pelos autores acima citados não apresentaram o gene para a enzima ADC,

levantando questionamentos sobre o fato desta enzima ser considerada intrínseca. Por outro lado, Sarhaddi e colaboradores (2016) encontraram o gene *bla_{ADC}* em todos os 54 isolados multidroga resistentes de *A. baumannii* provenientes de um centro de queimados no Iran. A presença deste gene em nosso isolado sensível é um alerta, visto que a qualquer momento poderia ser expresso e modificar o seu perfil de susceptibilidade para resistência aos β -lactâmicos.

Os genes de resistência a sulfonamidas (*sul2*) e aminoglicosídeos (*strA/strB*) detectados no isolado deste estudo têm sido relatados inseridos em elementos genéticos móveis como plasmídeos (HAMIDIAM et al., 2016; HAMIDIAN; HALL, 2016). O gene *sul2* foi encontrado próximo a uma transposase, indicando que este gene está inserido em um elemento genético móvel.

Além dos genes de resistência descritos, foi detectada a presença dos sistemas de efluxo multidroga da família RND (AdeFGH e AdeIJK) no isolado sensível de *A. nosocomialis*. Estes sistemas conjuntamente conferem resistência a β -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim, fluorquinolonas, eritromicina lincosaminas, tigeciclina, novobiocina, rifampicina além de outros compostos como corantes e detergentes aniônicos (COYNE et al., 2010; COYNE et al., 2011). Gordon e Wareham (2010) afirmam que os sistemas de efluxo só têm a capacidade de expulsar os antimicrobianos quando ativos ou superexpressos. Isto poderia justificar a ausência do perfil de multidroga resistência no isolado pesquisado neste estudo, mas destaca que mesmo com um perfil de ampla sensibilidade um ambiente hostil pode fazer com que estes genes sejam expressos.

Após análise dos dados obtidos neste estudo podemos concluir que os fatores de virulência presentes no isolado clínico sensível de *A. nosocomialis* podem contribuir para a colonização, infecção e persistência deste micro-organismo no ambiente hospitalar. Outro dado que vale a pena ser destacado é a presença de mecanismos de resistência, não estando restritos aos isolados multidroga resistentes, mas que em nosso isolado provavelmente não estão sendo expressos por ação de genes repressores. A presença destes genes pode conferir uma vantagem seletiva a esses micro-organismos que, quando expostos a situações desfavoráveis como, por exemplo, o uso de antimicrobianos em dosagens ou por tempo inadequados, podem expressar os genes de resistência como forma de defesa e em resposta a um ambiente hostil. Além disso, a facilidade com que os micro-organismos compartilham elementos genéticos móveis contribui para o aumento da resistência no ambiente hospitalar. Portanto, mesmo uma infecção causada por micro-organismo sensível requer uma atenção especial, tendo em vista que, em seu genoma,

vários genes de resistência podem ser expressos e, conseqüentemente, mudar o cenário da infecção e o desfecho clínico do paciente.

Referências

WISPLINGHOFF, H.; SCHMITT, R.; WOHRMANN, A. STEFANIK, D.; SEIFERT, H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, v. 66, n. 2, p. 174-181, 2007.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, vol.21(3), p.538-582, 2008.

DOUGHARI, H.J.; NDAKIDEMI, P.A.; HUMAN, I.S.; BENADE, S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes Environ.**, v. 26, n. 2, p. 101-112, 2011.

FALAGAS, M.E.; MOURTZOUKOU, E.G.; POLEMIS, M.; VATOPOULOS, A.C.; Greek System for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 13, p. 816-819, 2007.

NWADIKE, V.U.; OJIDE, C.K.; KALU, E.I. Multidrug resistant *Acinetobacter* infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a Nigerian Tertiary Hospital ICU. **Afr. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2014.

HARDING, C.M.; TRACY, E.N.; CARRUTHERS, M.D.; RATHER, P.N.; ACTIS, L.A.; MUNSON-JR, R.S. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. **MBio.**, v. 4, n. 4, 2013.

KRÖGER, C.; KARY, S. C.; SCHAUER, K.; CAMERON, A. D. S. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes (Basel).**, v. 8, n. 1, 2017.

TAN, R. M.; KUANG, Z.; HAO, Y.; LAU, G. W. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. **J Innate Immun.**, v. 6, n. 2, p. 227–239, 2014.

DE BREIJ, A.; GADDY, J.; VAN DER MEER, J.; KONING, R.; KOSTER, A.; VAN DEN BROEK, P.; ACTIS, L.; NIBBERING, P.; DIJKSHOORN, L. *CsuA/BABCDE*-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Res. Microbiol.**, v. 160, p. 213–218, 2009.

LIU, M. L.; SOO, P. C.; LING, S. R.; KUO, H. Y.; TANG, C.Y.; CHANG, K.C. The sensor kinase *bfmS* mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 47, p. 275–281, 2014.

PÉREZ, A.; PÉREZ-LLARENA, F.J.; GARCÍA, P.; KERFF, F.; BECEIRO, A.; GALLEN, M.; BOU, G. New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* spp. affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 9, p. 2407-11, 2014.

LIU, Y.; LIU, X. Detection of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in the Xuzhou region and analysis of drug resistance. **Exp Ther Med.**, v. 10; n. 3; p. 933-936, 2015.

ZHAO, R.Z.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.J.; MI, Z.H. Identification of a new subtype of *bla*_{ADC} produced by *Acinetobacter baumannii* isolated in children. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.**, v. 28, n. 10, p. 1009-12, 2007.

SARHADDI, N.; SOLEIMANPOUR, S.; FARSIANI, H.; MOSAVAT, A.; DOLATABADI, S.; SALIMIZAND, H.; AMEL-JAMEHDAR, S. Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn centre of northeast Iran. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 8, p. 60-66, 2016.

COYNE, S.; ROSENFELD, N.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 54, n. 10, p. 4389-93, 2010.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55(3), p.947-953, 2011.

GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 219–226, 2010.

HAMIDIAN, M.; AMBROSE, S.J.; HALL, R.M. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the sul2 sulphonamide and strAB streptomycin resistance genes. **Plasmid**, v. 87-88, p.43-50, 2016.

HAMIDIAN, M.; HALL, R.M. The resistance gene complement of D4, a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, resides in two genomic islands and a plasmid. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, p. 1730–1732, 2016.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo identificou um fenótipo de multidroga resistência entre os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* compatíveis com as taxas de resistência verificadas na literatura. Além disso, detectou a presença de sistemas de efluxo multidroga que podem contribuir de modo significativo para a expressão deste fenótipo, quando associados ou não a outros mecanismos genéticos de resistência (mutações em *gyrA* e *parC*, enzimas que degradam antibióticos), pois sabemos que a multidroga resistência em bactérias hospitalares tem causa multifatorial.

Outro dado interessante foi a detecção de determinantes de virulência e resistência em um isolado clínico de *Acinetobacter nosocomialis* sensível aos antimicrobianos. Os genes de virulência detectados contribuem na formação do biofilme bacteriano, enquanto os genes de resistência conferem resistência à cefalosporinas, sulfonamidas e aminoglicosídeos. Tais resultados alertam para possíveis mudanças no curso e no tratamento da infecção, pois em situações de estresse ambiental a bactéria pode expressar estes genes, contribuindo de forma negativa no prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; AHMED, I.; KUDO, T.; IIDA, T.; ALI, G. M.; FUJIWARA, T.; OHKUMA, M. heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. **Pak. J. Agri. Sci.**, v. 53, n. 1, p. 595-608, 2014.
- ABBO, A.; NAVON-VENEZIA, S.; HAMMER-MUNTZ, O.; KRICHALI, T.; SIEGMAN-IGRA, Y.; CARMELI, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, vol.11, p. 22-29, 2005.
- AGUSTÍ, C.; PUJOL, M.; ARGERICH, M.J.; AYATS, J.; BADÍA, M.; DOMÍNGUEZ, M.A.; CORBELLÀ, X.; ARIZA, J. Short-term effect of the application of selective decontamination of the digestive tract on different body site reservoir ICU patients colonized by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 49, p. 205-208, 2002.
- AKPAKA, P.E.; SWANSTON, W.H.; IHEMERE, H.N.; CORREA, A.; TORRES, J.A.; TAFUR, J.D.; MONTEALEGRE, M.C.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.8 p. 2670–2671, 2009.
- AL-OTAIBI, F.E.; BUKHARI, E.E.; BADR, M.; ALRABIAA, A.A. Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy. **Saudi Med J.**, vol. 37(9), p. 979-84, 2016.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; LIEVENS, B.; JACQUEMYN, H.; HERRERA, C.M. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 63, p. 1532-9, 2013.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 289, n.36, p.321-331, 1980.
- ANANDHAM, R.; WEON, H.Y.; KIM, S.J.; KIM, Y.S.; KIM, B.Y.; KWON, S.W. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **J Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 36-9, 2010.
- ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, p. 292–301, 2014.
- BABU, K. G.; LOKANATHA, D.; LAKSHMAIAH, K. C.; SURESH BABU, M. C.; JACOB, L. A.; BHAT, G. R.; VARDHANA, H.; SINHA, M.; VIJAYKUMAR, B. R.; SUMATI, B. G.; JAYSHREE, R. S. Bloodstream infections in febrile neutropenic patients at a tertiary cancer

institute in South India: A timeline of clinical and microbial trends through the years. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 37, n. 3, p. 174-182, 2016.

BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic, organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical Pharmacology**. vol.74(12), p.1686-1701, 2007.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 9(2), p. 148-165, 1996.

BERTINI, A.; POIREL, L.; BERNABEU, S.; FORTINI, D.; VILLA, L.; NORDMANN, P.; CARATTOLI, A. Multicopy *bla*_{OXA-58} gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2324-2328, 2007.

BIGLARI, S.; HANAFIAH, A.; MOHD-PUZI, S.; RAMLI, R.; RAHMAN, M.; LOPES, B.S. Antimicrobial resistance mechanisms and genetic diversity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a teaching hospital in Malaysia. **Microb Drug Resist.** 2016.

BOGAERTS, P.; CUZON, G.; NAAS, T.; BAURAING, C.; DEPLANO, A.; LISSOIR, B.; NORDMANN, P.; GLUPCZYNSKI, Y. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla*_{OXA-23} gene associated with IS*Aba4* in Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 4205-4206, 2008.

BONNET, R.; MARCHANDIN, H.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; JUMAS-BILAK, E.; SIROT, J. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, vol.46, p.2004-2006, 2002.

BONNIN, R.A.; POIREL, L.; NAAS, T.; PIRS, T.; SEME, K.; SCHRENZEL, J.; NORDMANN, P. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-I-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.18, p. E362–E365, 2012.

BONOMO, R.A; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, vol.43, p.49-56, 2006.

BOUVET, P. J.; GRIMONT, P.A. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 228–240, 1986.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M.; TOLENTINO, E.; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 776-778, 2005.

BRISOU, J.; PRÉVOT, A.R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 86, p. 722-728, 1954.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol. 57(1), p. 1-3, 2006.

BUCANEVE, G.; MICOZZI, A.; MENICHETTI, F.; MARTINO, P.; DIONISI, M. S.; MARTINELLI, G.; ALLIONE, B.; D'ANTONIO, D.; BUELLI, M.; NOSARI, A. M.; CILLONI, D.; ZUFFA, E.; CANTAFFA, R.; SPECCHIA, G.; AMADORI, S.; FABBIANO, F.; DELILIERIS, G. L.; LAURIA, F.; FOA, R.; DEL FAVERO, A. Levofloxacin to Prevent Bacterial Infection in Patients with Cancer and Neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 10, p. 977-987, 2005.

BUSH, K. Characterization of β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.33, n.3, p.259-263, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CABRAL, Adriane Borges. Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência. 168 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.

CARR, E.L.; KÄMPFER, P.; PATEL, B.K.; GÜRTLER, V.; SEVIOUR, R.J. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 953-963, 2003.

CARRER, A.; POIREL, L.; YILMAZ, M.; AKAN, O. A.; FERIHA, C.; CUZON, G.; MATAR, G.; HONDERLICK, P.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 1369–1373, 2010.

CARVALHO, Karyne Rangel. Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro. 163 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; SCHMIDT, F. J.; WALSH, T. R. Molecular characterization of a betalactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n.12, p. 4654-61, 2004.

CASTANHEIRA, M.; WANGER, A.; KRUZEL, M.; DESHPANDE, L. M.; JONES, R. N. Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3179–3180, 2008.

CATANEO, C.; CANINI, S. R. M. S.; CASTRO, P. T. O.; HAYASHIDA, M.; GIR, E. Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 5, p. 1-8, 2011.

CAVALCANTI, F. L. S.; MENDES-MARQUES, C. L.; VASCONCELOS, C.R, S.; CAMPOS, T. L.; REZENDE, A. M.; XAVIER, D. E.; LEAL, N. C.; DE-MELO-NETO, O. P.; MORAIS, M. M. C.; LEAL-BALBINO, T. C. High Frequency of OXA-253-Producing *Acinetobacter baumannii* in Different Hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2016.

CHANG, H.C.; WEI, Y.F.; DIJKSHOORN, L.; VANECHOUTTE, M.; TANG, C.T.; CHANG, T.C. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1632–1639, 2005.

CHAUDHARY, M.; PAYASI, A. Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, s.1, p. S217-23, 2014.

CHAWLA, K.; VISHWANATH, S.; MUNIM, F. Nonfermenting gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 144-148, 2013.

CHOI, J.Y.; KO, G.; JHEONG, W.; HUYS, G.; SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L.; KO, K.S. *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 63, p. 4402-6, 2013.

CHU, Y.W.; AFZAL-SHAH, M.; HOUANG, E.T.; PALEPOU, M.I.; LYON, D.J.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45(3), p. 710-714, 2001.

CHUANG, Y.Y.; HUANG, Y.C.; LIN, C.H.; SU, L.H.; WU, C.T. Epidemiological investigation after hospitalizing a case with pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **J. Hosp. Infect.**, vol.72(1), p.30-35, 2009.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (January 2015). **CLSI document M100-S25**, v.35, n.3, 2015.

COYNE, S.; ROSENFELD, N.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 54, n. 10, p. 4389-93, 2010.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55(3), p.947-953, 2011.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.; CASTRO, M.E.; STIER, C.J.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, vol.41(7), p.3403-3406, 2003.

DAMIER-PIOLLE, L.; MAGNET, S.; BRÉMONT, S.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 557-562, 2008.

DA SILVA, G.J.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J.C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L.; DUARTE, A. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 215(1), p. 33-39, 2002.

DAVIN-REGLI, A.; BOLLA, J.M.; JAMES, C.E.; LAVIGNE, J.P.; CHEVALIER, J.; GARNOTEL, E.; MOLITOR, A.; PAGÈS, J.M. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. **Curr Drug Targets.**, v. 9, n. 9, p. 750-9, 2008.

DE BREIJ, A.; GADDY, J.; VAN DER MEER, J.; KONING, R.; KOSTER, A.; VAN DEN BROEK, P.; ACTIS, L.; NIBBERING, P.; DIJKSHOORN, L. *CsuA/BABCDE*-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Res. Microbiol.**, v. 160, p. 213–218, 2009.

DEL MAR TOMÁS, M.; BECEIRO, A.; PÉREZ, A.; VELASCO, D.; MOURE, R.; VILLANEUVA, R.; MARTÍNEZ-BELTRÁN, J.; BOU, G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 12, p. 5172-5, 2005.

DERIS, Z.Z.; HARUN, A.; OMAR, M.; JOHARI, M.D.R. The prevalence and risk factors of nosocomial *Acinetobacter* blood stream infections in tertiary teaching hospital in north-eastern Malaysia. **Tropical Biomedicine**, vol.26(2), p.123–129, 2009.

DE SÁ CAVALCANTI, F.L.; MENDES-MARQUES, C.L.; VASCONCELOS, C.R.D.S.; DE LIMA CAMPOS, T.; REZENDE, A.M.; XAVIER, D.E.; LEAL, N.C.; DE-MELO-NETO, O.P.; DE MORAIS, M.M.C.; LEAL-BALBINO, T.C. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, n. 1, 2017.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, vol.5, p.939–951, 2007.

DJURIC, O.; JOVANOVIĆ, S.; STOSOVIC, B.; TOSIC, T.; JOVANOVIĆ, M.; MARKOVIC-DENIC, L. Antimicrobial resistance of selected invasive bacteria in a tertiary care center: results of a prospective surveillance study. **J Infect Dev Ctries.**, v. 10, n. 12, p. 1325-1331, 2016.

DONALD, H. M., W. SCAIFE, S. G. AMYES, AND H. K. YOUNG. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrob. Agents Chemother.** vol.44, p.196–199, 2000.

DORTET, L.; RADU, I.; GAUTIER, V.; BLOT, F.; CHACHATY, E.; ARLET, G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 455–457, 2008.

DOUGHARI, H.J.; NDAKIDEMI, P.A.; HUMAN, I.S.; BENADE, S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes Environ.**, v. 26, n. 2, p. 101-112, 2011.

DU, J.; SINGH, H.; YU, H.; JIN, F.X.; YI, T.H. *Acinetobacter plantarum* sp. nov. isolated from wheat seedlings plant. **Arch Microbiol.**, v. 198, n. 5, p. 393-8, 2016.

EL SALABI, A.; BORRA, P.S.; TOLEMAN, M.A.; SAMUELSEN, O.; WALSH, T.R. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-β-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.56(5), p.2241-2245, 2012.

FALAGAS, M.E.; MOURTZOUKOU, E.G.; POLEMIS, M.; VATOPOULOS, A.C.; Greek System for Surveillance of Antimicrobial Resistance. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 13, p. 816-819, 2007.

FARRUGIA, D.N.; ELBOURNE, L.D.; HASSAN, K.A.; EIJKELKAMP, B.A.; TETU, S.G.; BROWN, M.H.; SHAH, B.S.; PELEG, A.Y.; MABBUTT, B.C.; PAULSEN, I.T. The complete genome and phenome of a community-acquired *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

FEIZABADI, M.M.; FATHOLLAHZADEH, B.; TAHERIKALANI, M.; RASOOLINEJAD, M.; SADEGHIFARD, N.; ALIGHOLI, M.; SOROUGH, S.; MOHAMMADI-YEGANE, S. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla_{OXA}* genes among *Acinetobacter* spp. isolated from patients at Tehran hospitals. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 274-278, 2008.

FENG, G.D.; YANG, S.Z.; WANG, Y.H.; DENG, M.R.; ZHU, H.H. *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 64, p. 3417-21, 2014.

FIGUEIREDO, S.; POIREL, L.; PAPA, A.; KOULOURIDA, V.; NORDMANN, P. Overexpression of the naturally occurring *bla_{OXA-51}* gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS_{Aba9}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4045-4047, 2009.

FITZPATRICK, M. A.; OZER, E.A.; HAUSER, A. R. Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing *Acinetobacter* Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 593-612, 2016.

FOURNIER, P.E.; VALLENET, D.; BARBE, V.; AUDIC, S.; OGATA, H.; POIREL, L.; RICHET, H.; ROBERT, C.; MANGENOT, S.; ABERGEL, C.; NORDMANN, P.; WEISSENBAACH, J.; RAOULT, D.; CLAVERIE, J.M. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genet.**, v.2, p.62-72, 2006.

FRITSCHKE, T.R.; SADER, H.S.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. **Clin. Infect. Dis.**, v.41(4), p. 276-278, 2005.

GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacterbaumannii* biofilm formation. **Future Microbiol.**, v. 4, p. 273-278, 2009.

GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.B.; REIS, A.O.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from Brazilian teaching hospital. **Diagnost. Microbiol. Infec. Dis.**, v.45, p.77-79, 2003a.

GALLEN, M.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; ROSSOLINI, G.M.; SPENCER, J.; DIDEBERG, O.; FRÈRE, J.M.; THE METALLO- β -LACTAMASE WORKING GROUP. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.660-663, 2001.

GANTA, S. R.; PERUMAL, S.; PAGADALA, S. R.; SAMUELSEN, O.; SPENCER, J.; PRATT, R. F.; BUYNAK, J. D. Approaches to the simultaneous inactivation of metallo- and serine-betalactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 6, p. 1618–1622, 2009.

GARAU, G.; GARCÍA-SÁEZ, I.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLEN, M.; FRÈRE, J.M.; DIDEBERG, O. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2347-2349, 2004.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 277–282, 1991.

GERNER-SMIDT, P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2680–2685, 1992.

GIRLICH, D.; DAMACENO, Q. S.; OLIVEIRA, A. C.; NORDMANN, P. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, n. 5, p. 2976-8, 2014.

GKRANIA-KLOTSAS, E.; HERSHOW, R.C. Colonization or infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* may be an independent risk factor for increased mortality. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1224–1225, 2006.

GOOTZ, T. D.; LESCOE, M. K.; DIB-HAJJ, F.; DOUGHERTY, B. A.; HE, W.; DELLALATTA, P.; HUARD R. C. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 1998–2004, 2009.

GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 35, p. 219-26, 2010.

GOREN, M. G.; CARMELI, Y. SCHWABER, M. J.; CHMELNITSKY, I.; SCHECHNER, V.; NAVON-VENEZIA, S. Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014-1017, 2010.

GUR, D.; KORTEN, V.; UNAL, S.; DESHPANDE, L.M.; CASTANHEIRA, M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-

producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1529-1532, 2008.

HALL, B.G.; SALIPANTE, S.J.; BARLOW, M. Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo-beta-lactamases. **J. Mol. Evol.**, vol.59(1), p. 133-141. 2004.

HAMIDIAN, M.; HALL, R.M. The resistance gene complement of D4, a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, resides in two genomic islands and a plasmid. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, p. 1730–1732, 2016.

HARDING, C.M.; TRACY, E.N.; CARRUTHERS, M.D.; RATHER, P.N.; ACTIS, L.A.; MUNSON-JR, R.S. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. **MBio.**, v. 4, n. 4, 2013.

HENWOOD, C.J.; GATWARD, T.; WARNER, M.; JAMES, D.; STOCKDALE, M.W.; SPENCE, R.P.; TOWNER, K.J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 479– 487, 2002.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FOURNIER, P.E.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.49(10), p.4174-4179, 2005.

HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, vol.53(12), p.5035-5038, 2009.

HIGGINS, P. G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 233–238, 2010.

HINRICHSSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; LIRA, C.; SANTOS-JUNIOR, B. J.; CRUZ, P. W. S. Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. **Rev Panam Infectol.**, v. 16, p. 174–179, 2014.

HIRSCH, E. B; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumonia* carbapenemases: an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1119–1125, 2010.

HOUANG, E.T.; CHU, Y.W.; LO, W.S.; CHU, K.Y.; CHENG, A.F. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (*bla_{IMP-4}*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47(4), p.1382-1390, 2003.

HU, W.S.; YAO, S.M.; FUNG, C.P.; HSIEH, Y.P.; LIU, C.P.; LIN, J.F. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, n. 11, p. 3844-52, 2007.

HUSSAIN, M.; CARLINO, A.; MADONNA, M.J.; LAMPEN, J.O. Cloning and sequencing of the metallothioprotein β -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.164, n.1, p.223-229, 1985.

JÁCOME, Paula Regina Luna de Araújo. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE. Recife, 2011. 109 f. : Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.56(9), p.4990, 2012.

JÁCOME, P.R.; ALVES, L.R.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T.; SILVA, M.J.; LIMA, J.L.; ARAÚJO, P.S.; LOPES, A.C.; MACIEL, M.A. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **J Med Microbiol.**, vol. 65(7), p. 658-65, 2016.

JAURIN, B.; GRUNDSTROM, T. amp C cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 4897–4901, 1981.

JAWAD, A.; SEIFERT, H.; SNELLING, A.M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, 1998.

JERASSY, Z.; YINNON, A. M.; MAZOUZ-COHEN, S.; BENENSON, S.; SCHLESINGER, Y.; RUDENSKY, B.; RAVEH, D. Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **J. Hosp. Infect.**, v. 62, p. 230–236, 2006.

JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p.77-84, 2005.

JUNI, E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 349-371, 1978.

KARLOWSKY, J.A.; DRAGHI, D.C.; JONES, M.E.; THORNSBERRY, C.; FRIEDLAND, I.R.; SAHM, D.F. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p. 1681-1688, 2003.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M.A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.2253-2270, 2010.

KIM, D.; BAIK, K.S.; KIM, M.S.; PARK, S.C.; KIM, S.S.; RHEE, M.S.; KWAK, Y.S.; SEONG, C.N. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. **J Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 396-401, 2008.

KIM, P.S.; SHIN, N.R.; KIM, J.Y.; YUN, J.H.; HYUN, D.W.; BAE, J.W. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. **J Microbiol.**, v. 52, n. 8, p. 639-45, 2014.

KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; NEMEC, A. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. **Syst Appl Microbiol.**, v. 37, n. 7, p. 467-73, 2014.

KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; NEMEC, A. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 65, p. 3905-12, 2015a.

KRIZOVA, L.; MCGINNIS, J.; MAIXNEROVA, M.; NEMEC, M.; POIREL, L.; MINGLE, L.; SEDO, O.; WOLFGANG, W.; NEMEC, A. *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 65, p. 857-63, 2015b.

KRÖGER, C.; KARY, S. C.; SCHAUER, K.; CAMERON, A. D. S. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 1, 2017.

KUMAR, S.H.; DE, A.S.; BAVEJA, S.M.; GORE, M.A. Prevalence and Risk Factors of Metallo β -lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in Burns and Surgical Wards in a Tertiary Care Hospital. **J. Lab. Physicians.**, vol. 4(1), p. 39-42, 2012.

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E.P. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. **Biochemical Journal**, v.103, p.27-30, 1967.

LAHEY CLINIC. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, **LAHEY CLINIC**, 2014. Disponível em: < [http:// www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)>. Acesso em: 17 jan. 2017.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-90, 1999.

LEAVITT, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3026–3029, 2007.

LEE, S.O.; KIM, N.J.; CHOI, S.H.; HYONG KIM, T.; CHUNG, J.W.; WOO, J.H.; RYU, J.; KIM, Y.S. Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*; a Case-Control Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48(1), p.224-228, 2004.

LEE, K.; YUM, J. H.; YONG, D.; LEE, H. M., KIM, H. D.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.

LEE, Y.; YUM, J.H.; KIM, C.K.; YONG, D.; JEON, E.H.; JEONG, S.H.; AHN, J.Y.; LEE, K. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*_{OXA-66} gene. **Ann Clin Lab Sci.**, v. 40, n. 1, p. 43-8, 2010.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, p. 159-204, 2004.

LI, Y.; PIAO, C.G.; MA, Y.C.; HE, W.; WANG, H.M.; CHANG, J.P.; GUO, L.M.; WANG, X.Z.; XIE, S.J.; GUO, M.W. *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of *Populus x euramericana* canker bark. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.63, p. 2963-2969, 2013.

LI, W.; ZHANG, D.; HUANG, X.; QIN, W. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 64, p. 1507-13, 2014a.

LI, Y.; HE, W.; WANG, T.; PIAO, C.G.; GUO, L.M.; CHANG, J.P.; GUO, M.W.; XIE, S.J. *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus x euramericana*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 64, p. 1043-50, 2014b.

LI, Y.; CHANG, J.; GUO, L.M.; WANG, H.M.; XIE, S.J.; PIAO, C.G.; HE, W. Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of *Populus x euramericana* canker. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 65, n. 12, p. 4461-8, 2015.

LIN, M-F.; LIN, Y-Y.; TU, C-C.; LAN, C-Y. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2015.

LIU, M. L.; SOO, P. C.; LING, S. R.; KUO, H. Y.; TANG, C.Y.; CHANG, K.C. The sensor kinase *bfmS* mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 47, p. 275–281, 2014.

LIU, F.; ZHU, Y.; YI, Y.; LU, N.; ZHU, B.; HU, Y. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. **BMC Genomics**, v. 15, 2014.

LIU, Y.; LIU, X. Detection of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in the Xuzhou region and analysis of drug resistance. **Exp Ther Med.**, v. 10; n. 3; p. 933-936, 2015.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.47(3), p.247-250, 2001.

LIVERMORE, D.M.; BROWN, D.F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.48(1), p.59-64, 2001.

LUO, L.L.; JIANG, X.F.; WU, Q.; WEI, L.M.; LI, J.H.; YING, C.M. Efflux Pump Overexpression in Conjunction with Alternation of Outer Membrane Protein May Induce *Acinetobacter baumannii* Resistant to Imipenem. **Chemotherapy**, vol. 57, p.77–84, 2011.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.45, p.3375-3380, 2001.

MALHOTRA, J.; ANAND, S.; JINDAL, S.; RAJAGOPAL, R.; LAL, R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 62, p. 2883-90, 2012.

MARAGAKIS, L.L.; COSGROVE, S.E.; SONG, X.; KIM, D.; ROSENBAUM, P.; CIESLA, N.; SRINIVASAN, A.; ROSS, T.; CARROLL, K.; PERL, T.M. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated With Pulsatile Lavage Wound Treatment. **Journal of the American Medical Association**, v.292(24), p.3006-3011, 2004.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, vol.46, p.1254-1263, 2008.

MARCHAND, I.; DAMIER-PIOLLE, L.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.48(9), p.3298-3304, 2004.

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO, A.B.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v. 37, p. 474-476, 2009.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n.2, 2006.

MENDES, R. E.; BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 55–59, 2009.

MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M.Y.; HANIFAH, Y.A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Med. J.**, v. 46, n. 9, p. 461-464, 2005.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MOUBARECK, C.; BRÉMONT, S.; CONROY, M.C.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3579–81, 2009.

MUGNIER, P.; POIREL, L.; PITOUT, M.; NORDMANN, P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. **Clinical Microbiology and Infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 879-882, 2008.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; RASHEED, J. K.; SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B.; CARMELI, Y.; ISRAELI KPC KPN STUDY GROUP. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumonia* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 818–820, 2009.

NEMEC, A.; DE BAERE, T.; TJERNBERG, I.; VANECHOUTTE, M.; VAN DER REIJDEN T.J.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51(Pt 5), p. 1891-1899, 2001.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; CLEENWERCK, I.; DE BAERE, T.; JANSSENS, D.; VAN DER REIJDEN, T.J.; JEZEK, P.; VANECHOUTTE, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a

small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1563-1567, 2003.

NEMEC, A.; MUSÍLEK, M.; MAIXNEROVÁ, M.; DE BAERE, T.; VAN DER REIJDEN, T.J.; VANECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 59, p. 118-24, 2009.

NEMEC, A.; MUSÍLEK, M.; SEDO, O.; DE BAERE, T.; MAIXNEROVÁ, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.; ZDRÁHAL, Z.; VANECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 60, p. 896-903, 2010.

NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.; DESCHAGHT, P.; PASSET, V.; VANECHOUTTE, M.; BRISSE, S.; DIJKSHOORN, L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Res Microbiol.**, v. 162, n. 4, p. 393-404, 2011.

NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; BRISSE, S.; HIGGINS, P.G. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 65, p. 934-42, 2015.

NEMEC, A.; RADOLFOVA-KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VRESTIAKOVA, E.; JEZEK, P.; SEDO, O. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1673-85, 2016.

NHO, J.S.; JUN, S.H.; OH, M.H.; PARK, T.I.; CHOI, C.W.; KIM, S.I.; CHOI, C.H.; LEE, J.C. *Acinetobacter nosocomialis* secretes outer membrane vesicles that induce epithelial cell death and host inflammatory responses. **Microb Pathog.**, v. 81, p. 39-45, 2015.

NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 209-211, 1988.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 228–236, 2009.

NWADIKE, V.U.; OJIDE, C.K.; KALU, E.I. Multidrug resistant *Acinetobacter* infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a Nigerian Tertiary Hospital ICU. **Afr. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2014.

OPAZO, C. A.; MELLA, M. S.; DOMÍNGUEZ, Y. M.; BELLO, T. H.; GONZÁLEZ, R. G. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. **Rev Chil Infect.**, v. 26, n. 6, p. 499-503, 2009.

OPAZO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H.; AMYES, S.G.B.; GONZÁLEZ-ROCHA, G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6(4), p. 311-316, 2012.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p.71-78, 1994.

PAGÈS, J.M.; JAMES, C.E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol.**, v. 6, n. 12, p. 893-903, 2008.

PATERSON, D.L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, vol.43, p.43-48, 2006.

PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J.; AMYES, S.G. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, vol.2(2), p.81-87, 1993.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265–268, 2009.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, vol.21(3), p.538-582, 2008.

PELEG, A.Y.; DE BREIJ, A.; ADAMS, M.D.; CERQUEIRA, G.M.; MOCALI, S.; GALARDINI, M.; NIBBERING, P.H.; EARL, A.M.; WARD, D.V.; PATERSON, D.L.; SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L. The success of *Acinetobacter* species: genetic, metabolic and virulence attributes. **PLoS One.**, v. 7, n. 10, 2012.

PÉREZ, A.; PÉREZ-LLARENA, F.J.; GARCÍA, P.; KERFF, F.; BECEIRO, A.; GALLEN, M.; BOU, G. New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* spp. affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 9, p. 2407-11, 2014.

PFEIFER, Y.; WILHARM, G.; ZANDER, E.; WICHELHAUS, T.A.; GOTTIG, S.; HUNFELD, K.P.; SEIFERT, H.; WITTE, W.; HIGGINS, P.G. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.66, p.1998-2001, 2011.

POIREL, L.; MENUTEAU, O.; AGOLI, N.; CATTOEN, C.; NORDMANN, P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 8, p. 3542-7, 2003.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol.50, p.1442-1448, 2006a.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, p. 826-836, 2006b.

POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, p. 501–512, 2007.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 24–38, 2010.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; AL, NAIEMI, N. A.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in The Netherlands. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p. 2420–2424, 2010a.

POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 3072, 2010b.

PONGAS, G.; HAMILOS, G.; ROLSTON, K.V.; KONTOYIANNIS, D.P. Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center (1998–2008): diverse and impactful. **Supportive Care in Cancer**. v.20, p. 261–265, 2012.

POOLE, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, vol.3, p.77-98, 2002.

POPPEL, M.T.; SKIEBE, E.; LAUE, M.; BERGMANN, H.; EBERSBERGER, I.; GARN, T.; FRUTH, A.; BAUMGARDT, S.; BUSSE, H.J.; WILHARM, G. *Acinetobacter equi* sp. nov. isolated from horse faeces. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 2015.

PRASHANTH, K.; BADRINATH, S. Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol.24(1), p.39-44, 2006.

QI, Y.; WEI, Z.; LI, L.; JI, S.; DU, X.; SHEN, P, YU, Y. Detection of a common plasmid carrying *blaKPC-2* in Enterobacteriaceae isolates from distinct cities in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 4, p. 297-301, 2010.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440–458, 2007.

RAJAMOHAN, G.; SRINIVASAN, V.B.; GEBREYES, W. A. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, n. 9, p. 1919-25, 2010.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p.223–232, 1997.

RICHMOND, G.E.; EVANS, L.P.; ANDERSON, M.J.; WAND, M.E.; BONNEY, L.C.; IVENS, A.; CHUA, K.L.; WEBBER, M.A.; SUTTON, J.M.; PETERSON, M.L.; PIDDOCK, L.J. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. **mBio**, v. 7, n. 2, 2016.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEON, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 1354–1357, 2010.

ROCHE, C.; COTTER, M. O.; CONNELL, N.; CROWLEY, B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 13, p. 1-2, 2009.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; CISNEROS, J.M. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8(11), p.687-693, 2002.

ROSSAU, R.; LANDSCHOOT, A.V.; GILLIS, M.; LEY, J.D. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 310-319, 1991.

ROSSOLINI, G.M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Disease**, v.41, n. p.1557-1558, 2005.

RUMBO, C.; LÓPEZ, M.; RUIZ DE ALEGRÍA, C.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; VILA, J.; PACHÓN, J.; CISNEROS, J. M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A.; BOU, G.; TOMÁS, M., on behalf of the Spanish Group of Nosocomial Infections and Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials (GEIH-GEMARA) from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Contribution of Efflux Pumps, Porins, and β -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5247-57, 2013.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase form *Bacillus cereus* 569. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 11c-13c, 1966.

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, vol.25(1), P. 57-61, 2005.

SAHL, J.W.; JOHNSON, J.K.; HARRIS, A.D.; PHILLIPPY, A.M.; HSIAO, W.W.; THOM, K.A.; RASKO, D.A. Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

SARHADDI, N.; SOLEIMANPOUR, S.; FARSIANI, H.; MOSAVAT, A.; DOLATABADI, S.; SALIMIZAND, H.; AMEL-JAMEHDAR, S. Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn centre of northeast Iran. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 8, p. 60-66, 2016.

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 425-429, 2005.

SEKIGUCHI, J. I.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M. MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M. KIRIKAE, T. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194–4197, 2008.

SIMHON, A.; RAHAV, G.; SHAZBERG, G.; BLOCK, C.; BERCOVIER, H.; SHAPIRO, M. *Acinetobacter baumannii* at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Jerusalem, Israel. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 39(1), p. 389-391, 2001.

SINHA, M.; SRINIVASA, H. Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem-resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol.25, p.121-125, 2007.

SMET, A.; COOLS, P.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; HAESBROUCK, F.; KEMPF, M.; NEMEC, A.; VANEECHOUTTE, M. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 64, p. 4007-15, 2014.

SOHRABI, N.; FARAJNIA, S.; AKHI, M.T.; NAHAIEI, M.R.; NAGHILI, B.; PEYMANI, A.; AMIRI, Z.; REZAEI, M.A.; SAEEDI, N. Prevalence of OXA-type beta-lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. **Microb. Drug. Resist.**, v. 18, p. 385-389, 2012.

SRINIVASAN, V.B.; RAJAMOCHAN, G.; PANCHOLI, P.; MARCON, M.; GEBREYES, W.A. Molecular cloning and functional characterization of two novel membrane fusion proteins in conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 66, n. 3, p. 499-504, 2011.

STOEVA, T.; HIGGINS, P. G.; BOJKOVA, K.; SEIFERT, H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 723–727, 2008.

SU, X.Z.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4362-4, 2005.

TAN, R. M.; KUANG, Z.; HAO, Y.; LAU, G. W. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. **J Innate Immun.**, v. 6, n. 2, p. 227–239, 2014.

TOGNIM, M.C.; GALES, A.C.; PENTEADO, A.P.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, vol.27(7), p.742-7, 2006.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.

TOMARAS, A. P.; DORSEY, C. W.; EDELMANN, R. E.; ACTIS, L. A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. (Pt 12), p. 3473-84, 2003.

TOWNER, K. J.; LVI, K.; VLASSIADI, M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p.161-167, 2008.

TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, p. 72-77, 2006.

URBAN, C.; BRADFORD, P. A.; TUCKMAN, M.; SEGAL-MAURER, S.; WEHBEH, W.; GRENNER, L.; COLON-URBAN, R.; MARIANO, N.; RAHAL, J. J. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 127–130, 2008.

VAHABOGLU, H.; OZTÜRK, R.; AYGÜN, G.; COŞKUNKAN, F.; YAMAN, A.; KAYGUSUZ, A.; LEBLEBICIOGLU, H.; BALIK, I.; AYDIN, K.; OTKUN, M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 41, n. 10, p. 2265-9, 1997.

VALLENET, D.; NORDMANN, P.; BARBE, V.; POIREL, L.; MANGENOT, S.; BATAILLE, E.; DOSSAT, C.; GAS, S.; KREIMEYER, A.; LENOBLE, P., et al. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. **PLoS One.**, vol.3(3), p.1805, 2008.

VANEECHOUTTE, M.; TJERNBERG, I.; BALDI, F.; PEPI, M.; FANI, R.; SULLIVAN, E.R.; VAN DER TOORN, J.; DIJKSHOORN, L. Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as “*Acinetobacter venetianus* sp. nov.” belong to the same genomic species. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 69–73, 1999.

VAZ-MOREIRA, I.; NOVO, A.; HANTSIS-ZACHAROV, E.; LOPES, A.R.; GOMILA, M.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M.; HALPERN, M. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 61, p. 2837-43, 2011.

VILA, J.; MARTI, S.; SANCHEZ-CEPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.59(6), p.1210-1215, 2007.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1553–1555, 2007.

WALSH, T.R.; BOLMSTROM, A.; QWARNSTROM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. **J. Clin. Microbiol.**, vol.40(8), p.2755-2759, 2002.

WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 306–325, 2005.

WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl 3, p. S8–S14, 2010.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 373–383, 2006.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.35, n.1, p.147-151, 1991.

WISPLINGHOFF, H.; SCHMITT, R.; WOHRMANN, A.; STEFANIK, D.; SEIFERT, H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, v. 66, n. 2, p. 174-181, 2007.

WOLTER, D. J.; KURPIEL, P. M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; GOERING, R. V.; HANSON, N. D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 557-562, 2009.

WOODFORD, N.; TIerno JR, P. M.; YOUNG, K.; TYSALL, L.; PALEPOU, M. F.; WARD, E.; PAINTER, R. E.; SUBER, D. F.; SHUNGU, D.; SILVER, L. L.; INGLIMA, K.; KORNBLUM, J.; LIVERMORE D. M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 4793–4799, 2004.

WU, Q.; LIU, Q.; HAN, L.; SUN, J.; NI, Y. Plasmid-mediated carbapenemhydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring highlevel aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 326–328, 2010.

YAN, Z. Q.; SHEN, D. X.; CAO, J. R.; CHEN, R.; WEI, X.; LIU, L. P.; XU, X. L. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 269–273, 2010.

YANG, C.M.; LIN, M.F.; LIAO, P.C.; YEH, H.W.; CHANG, B.V.; TANG, T.K.; CHENG, C.; SUNG, C.H.; LIOU, M.L. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. **Lett. Appl. Microbiol.**, vol.48(5), p. 560-565, 2009.

YONG, D.; SHIN, J.H.; KIM, S.; LIM, Y.; YUM, J.H.; LEE, K.; CHONG, Y.; BAUERNFEIND, A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p.1749-51, 2003.

YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel sub group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2007.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 5046–5054, 2009.

YUM, J.H.; YI, K.; LEE, H.; YONG, D.; LEE, K.; KIM, J.M.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes. **J. Antimicrob. Chemother.**, vol.49(5), p.837-840, 2002.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHANG, R.; ZHOU, H. W.; CAI, J. C.; CHEN, G. X. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 574–576, 2007.

ZHANG, R.; YANG, L.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHEN, G. X. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.332–337, 2008.

ZHANG, C.; QIU, S.; WANG, Y.; QI, L.; HAO, R.; LIU, X.; SHI, Y.; HU, X. AN, D.; LI, Z.; LI, P.; WANG, L.; CUI, J.; WANG, P.; HUANG, L.; KLENA, J.D.; SONG, H. Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. **PLoS ONE**, v.8(6), e64857, 2013.

ZHAO, R.Z.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.J.; MI, Z.H. Identification of a new subtype of *bla*_{ADC} produced by *Acinetobacter baumannii* isolated in children. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.**, v. 28, n. 10, p. 1009-12, 2007.

ZHOU, H.; YANG, Q.; YU, Y. S.; WEI, Z. Q.; LI, L. J. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 45, N. 12, p. 4054–4057, 2007.

ZHU, L.; YAN, Z.; ZHANG, Z.; ZHOU, Q.; ZHOU, J.; WAKELAND, E.K.; FANG, X.; XUAN, Z.; SHEN, D.; LI, Q.Z. Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

ZONG, Z.; LU, X.; VALENZUELA, J. K.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. An outbreak of carbapenemresistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 50–54, 2008.

APÊNDICE A – Artigo 1 em inglês

Title: Multidrug efflux systems genetic detection in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from cancer patients in Recife, Pernambuco, Brazil

Authors: Lilian Rodrigues Alves¹; Adriane Borges Cabral²; Carina Mendes Marques³; Nilma Cintra Leal³; Paulo Sérgio Ramos de Araújo³; Ana Catarina de Souza Lopes¹; Maria Amélia Vieira Maciel¹

1 Universidade Federal de Pernambuco

2 Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

3 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz/PE

MSc. Lilian Rodrigues Alves* (*Corresponding author)

Departamento de Medicina Tropical

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife, PE.

Brazil 50.732-970

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Tel.: +55 81 21268526

Fax: +55 81 21268527

Abstract

Acinetobacter baumannii is an essentially opportunistic pathogen and is involved in cases of healthcare-related infections, most often in immunocompromised patients, as well as in patients in intensive care units, burned out and in cancer treatment. The mechanisms that confer resistance to bacterial species of *Acinetobacter* are diverse and can be divided into three groups: production of enzymes capable of inactivating the activity of antimicrobial agents, alterations or loss of porins and increased expression of active efflux systems. The objective of this work was to determine the antimicrobial susceptibility and to perform the detection of the efflux systems by total genomic sequencing of the clinical isolates of *A. baumannii* during the year 2014 in a public hospital of reference in the treatment of cancer in the city of Recife, Pernambuco. Five isolates of *A. baumannii* were selected for the study to determine their antimicrobial susceptibility profile and genomic sequencing. All isolates showed a multidrug resistance phenotype. The antimicrobials with the highest resistance rates were ceftriaxone,

ceftazidime, imipenem, meropenem and ciprofloxacin followed by cefepime, amikacin and gentamicin. The most active antimicrobials against *A. baumannii* were ampicillin / sulbactam, levofloxacin and polymyxin B. In relation to efflux systems, genes coding for MATE, RND and MFS families were found in resistant isolates, in addition to other associated resistance mechanisms. This study underscores the importance of genetic investigation of resistance mechanisms in clinical isolates of *AA. baumannii* which, when expressed together, may hinder treatment and consequently favor a poor prognosis for the patient.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*.; multi-drug resistance; efflux pumps; genomic sequencing.

Introduction

Over the years, *Acinetobacter baumannii* has become one of the most important opportunistic pathogens causing health care-related infections (HAIs). This type of infection poses a significant threat to immunocompromised patients, particularly in patients with cancer, with or without neutropenia, due to the effects that the chemotherapy treatment causes on their immune system [1-4].

An important characteristic of *Acinetobacter* species is that they are prone to develop bacterial resistance rapidly, being associated with the selective pressure of the antimicrobial agents used. Such resistance is widespread worldwide, making it difficult to treat infections caused by bacteria of this genus [3-4].

It is believed that the development of multidrug resistance in *A. baumannii* is due to the expression of mechanisms such as: (1) production of enzymes that inactivate antimicrobials, (2) loss of porins; (3) and hyperexpression of efflux systems. Such mechanisms, when expressed together, lead to a considerable increase in antimicrobial resistance rates [5-8].

Among the efflux systems described in *A. baumannii* species, the most frequent are RND (resistance-nodulation-cell division) and MFS (major facilitator superfamily), however other efflux systems also contributes for the currently multi-resistance scenario [9-13].

The analysis of isolates regarding their susceptibility profile and resistance mechanisms are important to characterize HAIs, and to apply measures for prevention and control of these infections. Hence, the purpose of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility profile in *A. baumannii* clinical isolates and to detect, by genomic sequencing, the efflux systems and associated resistance mechanisms in isolates of *A. baumannii* from oncology patients hospitalized in a hospital reference public for the treatment of cancer, located in Recife, Pernambuco, Brazil.

Materials and methods

Bacterial isolates

The biological samples were collected by healthcare professionals from a public hospital, specialized in the cancer treatment in Recife, Pernambuco, during 2014. These samples were sent to the laboratory to perform the bacterial isolation, biochemical identification, and antimicrobial susceptibility profile.

Five multidrug resistant isolates of *Acinetobacter* spp. were provided by the hospital laboratory, seeded on Casoy agar slants and transported to the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (Departamento de Medicina Tropical/UFPE), for further analysis. All isolates were inoculated in BHI broth and incubated at 37°C for 24 hours. Subsequently, the strains were seeded on EMB agar to observe microbiological characteristics and then were stocked in BHI broth containing glycerol and stored at -20°C. To confirm the bacterial species, identification was performed using the MALDI-TOF technique, in collaboration with the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ/PE.

Antimicrobial susceptibility profile

After analysis of the purity of *A. baumannii* isolates, the microdilution broth method was performed according to the guidelines by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The following antimicrobials were used: Ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin and polymyxin B. The results were determined by the minimum inhibitory concentration of the antimicrobial agents ($\mu\text{g/mL}$) [14].

DNA extraction

DNA extraction was performed using the Brazol kit (LGC-Biotechnology), according to the protocol provided by the manufacturer. The bacterial DNA was quantified and subsequently stored at -20°C.

DNA library construction and genome sequencing

DNA library construction was performed using the Nextera XT kit (Illumina). The quantification of the libraries was performed by Real-Time PCR using the Library Quantification Kit (Illumina) and 7500 equipment (Applied BioSystems). Genome sequencing was performed using paired-end and data were generated on MiSeq platform (Illumina) and MiSeq Reagent kit v3 600-cycle (Illumina).

Genome sequencing assembly and annotation

Initially, the quality of the fragments was analyzed using the FASTQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Low-quality sequences were examined and then trimmed by Trimmomatic v 0.32. Subsequently, the contigs were assembled using the *velveth* and *velvetg* programs, as well as *VelvetOptimiser*. (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). *Prokka* was used for protein prediction and annotation. Contigs were alignment and reordered by the *Mauve* program. All data related to assembly, prediction and annotation of coding genes were stored in a relational database using MySQL.

Results

Characterization of isolates, antimicrobial susceptibility profile and genetic detection of efflux systems

The five isolates of *A. baumannii*, selected because their resistance profile, were obtained from the following biological samples: blood (n=1), tracheal secretion (n=2), catheter tip (n=1) and cavity fluid (n=1). Regarding the hospital sector, four of the five patients were from the intensive care unit (ICU), and one was from the hematology section (table 1).

In relation to the antimicrobial susceptibility profile, this was done through the broth microdilution technique that revealed the resistance multidrug phenotype of the *A. baumannii* isolates tested. All isolates were resistant to ceftriaxone (MIC ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$), ceftazidime (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), imipenem (MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), meropenem (MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), and ciprofloxacin (MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). Resistance to cefepime (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) was observed in four isolates. Three isolates were resistant to amikacin (MIC ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) and to gentamicin (MIC ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$). The isolates tested presented highest sensitivity against Levofloxacin, polymyxin B, and ampicillin/sulbactam (table 1 and 2).

Considering the annotations obtained by genomic sequencing, it was possible to detect, in all isolates, the presence of several genes from efflux systems belonging to the MATE, RND and MFS families (table 1).

Table 1. Characterization of the isolates of *Acinetobacter baumannii* on the site and sector of isolation, antimicrobial susceptibility profile and genes of multidrug efflux systems

Bacterial isolate	Body site	Sector of internment	Susceptibility profile	Genes from efflux systems
Acb_43	Blood	ICU	Sensitive (APS, LEV, AMI, GEN, POL B); Intermediary (CPM); Resistant (CRO, CAZ, IPM, MPM, CIP)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_44	Tracheal secretion	ICU	Sensitive (APS, LEV, POL B); Resistant (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeR</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_45	Catheter tip	Hematology	Sensitive (APS, POL B); Intermediary (LEV); Resistant (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeC</i> , <i>adeR</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_46	Tracheal secretion	ICU	Sensitive (APS, LEV, AMI, GEN, POL B); Resistant (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeR</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).
Acb_47	Cavity fluid	ICU	Sensitive (APS, LEV, POL B); Resistant (CRO, CAZ, CPM, IPM, MPM, CIP, AMI, GEN)	MATE (<i>abeM</i>); RND (<i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeS</i> , <i>adeF</i> , <i>adeG</i> , <i>adeH</i> , <i>adeN</i> , <i>adeI</i> , <i>adeJ</i> , <i>adeK</i> , <i>adeL</i> , <i>adeT1</i>); MFS (<i>amvA</i>).

Note: Acb = *Acinetobacter baumannii*; ICU = intensive care unit; APS = ampicillin/sulbactam; CRO = ceftriaxone; CAZ = ceftazidime; CPM = cefepime; IPM = imipenem; MPM = meropenem; CIP = ciprofloxacin; LEV = levofloxacin; AMI = amikacin; GEN = gentamicin; POL B = polymyxina B; MATE = *multidrug and toxic compounds extrusion* family; RND = *resistance-nodulation-cell division* family; MFS = *major facilitator superfamily*.

Table 2. Profile of antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* by broth microdilution

Antimicrobiano	Acb_43	Acb_44	Acb_45	Acb_46	Acb_47
Ampicillin/Sulbactam	S ($\leq 1/0,5$)	S (1/0,5)	S (4/2)	S (1/0,5)	S ($\leq 1/0,5$)
Ceftriaxone	R (>128)	R (>128)	R (>128)	R (>128)	R (>128)
Ceftazidime	R (128)	R (>128)	R (>128)	R (128)	R (>128)
Cefepime	I (16)	R (32)	R (128)	R (32)	R (32)
Imipenem	R (>64)	R (64)	R (64)	R (32)	R (64)
Meropenem	R (>64)	R (>64)	R (>64)	R (>64)	R (>64)
Ciprofloxacin	R (>32)	R (>32)	R (>32)	R (>32)	R (>32)
Levofloxacin	S (2)	S (2)	I (4)	S (2)	S (2)
Amikacin	S (≤ 2)	R (128)	R (32)	S (4)	R (64)
Gentamicin	S (2)	R (>64)	R (>64)	S (2)	R (>64)
Polymyxin B	S (2)	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)

Note: Acb = *Acinetobacter baumannii*; S = sensitive; I = intermediary; R = resistant. PS: The values in parentheses refer to MIC value (minimum inhibitory concentration) in $\mu\text{g} / \text{mL}$ (micrograms per milliliter).

Discussion

In this study, we characterized five multidrug resistant clinical isolates of *A. baumannii*. This pathogen is one of the leading causes of infections in hospitalized patients, with or without cancer, in the last years. The occurrence of *A. baumannii* in the hospital environment is due to its multidrug resistance profile [3; 15-16].

Recent studies showed that the frequency of multidrug resistant isolates, especially in hospital facilities, has been increasing. Jácome and collaborators (2016) [3] analyzed 169 clinical isolates of *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp., obtained from hospitalized patients with solid neoplasms in Recife. The frequency of multidrug resistant strains was 77.8% for *Acinetobacter* spp., 64 % for *Klebsiella* spp. and 58.6% for *P. aeruginosa*. As this study indicates, isolates of *Acinetobacter* spp. present high rate of multidrug resistance, which corroborates with our results since all our isolates were resistant to the most part of the antimicrobials tested. The isolates Acb_43 and Acb_46 presented resistance to β -lactams, carbapenems, and fluoroquinolones, whereas isolates Acb_44, Acb_45, and Acb_47 were also resistant to aminoglycosides, beyond the above-mentioned classes.

Data that corroborate with Jácome and collaborators (2016) were obtained by Hinrichsen and collaborators (2014) [17] who, analyzing 137 clinical isolates of *Acinetobacter* spp., from two private tertiary hospitals in Recife observed a high multidrug resistance rate: 86.0% for hospital A and 53.0% for hospital B. These results demonstrate that in Recife, there is a high frequency of detection of *Acinetobacter* spp. multiresistant in a hospital environment, be it public or private administration.

Additionally, studies conducted in hospitals in Malaysia and Serbia also found high rates of multidrug resistant isolates of *Acinetobacter* spp., 77.2% and 98.7%, respectively [18-19]. In this context, the occurrence of multidrug resistant *A. baumannii* strains has been frequent not only in Recife, but also in different hospitals worldwide.

The first efflux system found among our isolates was AbeM. This pump belongs to MATE family and remove antimicrobials, such as aminoglycosides, fluoroquinolones, chloramphenicol, trimethoprim as well other compounds like ethidium bromide and dyes [11].

High rates of resistance to fluorquinolones and aminoglycosides observed in bacterial specimens in our study may be a consequence of the expression of the AbeM efflux system and / or other associated resistance mechanisms, such as mutations in the *gyrA* and *parC* (QRDRs) genes, and the presence of aminoglycoside modifying enzymes, both detected in our isolates (unpublished data).

The system AbeM was initially described as a hypothetical protein. In 2005, Su and collaborators [20] described its potential function. Comparing this protein sequencing using BLAST, it was found an identity of 34% to 39% and similarity of 75% to 77% with efflux proteins from other bacterial species, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Haemophilus influenzae*. The authors concluded that AbeM protein was likely to be a member of the MATE family of efflux systems responsible for expelling multiple antimicrobials from the bacterial cell.

However, according to Coyne and collaborators (2011) [11], the importance of system AbeM for the development of multidrug resistance in *A. baumannii* remains hypothetical, since the AbeM gene has been found in several clinical isolates without any correlation with antibiotic resistance even in isolates that overexpress this gene, suggesting a weak impact of this system.

The efflux system RND is most frequently found in clinical isolates of the genus *A. baumannii* and may, when expressed, contribute to the resistance phenotype in clinical isolates. According to the data obtained in this study show that the AdeABC, AdeFGH and AdeIJK efflux systems are frequent. The presence of these three efflux systems in the five isolates of *A.*

baumannii studied may justify the multidrug resistance profile observed, since the antimicrobial agents tested are specific substrates for these efflux systems.

Additionally, in four of the five isolates surveyed (Acb_43, Acb_44, Acb_46 and Acb_47) there was detection of a carbapenemase variant OXA-143, OXA-253, data recently published by De Sá Cavalcanti et al. (2017) [23]. It is possible to analyze, in table 2, the high MIC values for the antibiotics in the isolates that simultaneously possess the efflux systems and the enzyme OXA-253. Enzymes of the carbapenemase type when associated with active efflux systems contribute significantly to the increase of rates of resistance to multiple antibiotics in clinical isolates of *A. baumannii*, as can be observed in studies published by Hu et al. (2007) [21] and Lee et al. collaborators (2010) [22].

To prove the ability of these systems to cause multiresistant phenotypes, several studies were conducted comparing isolates of *A. baumannii* that had the efflux systems with mutants of the same isolates showing intentional deletion of these systems. The results obtained were similar for the AdeABC, AdeFGH and AdeIJK efflux pumps, where the isolates with the aforementioned efflux systems had higher MIC values for the antimicrobials when compared to the mutant isolates, which showed a decrease in MIC values [24-26].

The efflux system *adeT* was detected in four of the five isolates tested in this study (Acb_43, Acb_44, Acb_46 e Acb_47). The function of this system is still not fully known, because if we take into account the data available in the literature, only one study was performed by Srinivasan and collaborators (2011) [27]. This study was based on the molecular cloning and functional characterization of two membrane fusion proteins (MFP) - *adeT1* and *adeT2* - that could possibly be involved in antimicrobial resistance in *A. baumannii* isolates. The analyzes showed an accumulation of ciprofloxacin in the bacterial cell, evidencing a decrease of the efflux in the mutant isolate that had the deletion of the *adeT1* gene when compared to the original isolate. The presence of the *adeT1* and *adeT2* genes increased MIC values for ciprofloxacin. When EPIs (“efflux pump inhibitors”) were used, the accumulation of ciprofloxacin within the bacterial cells increased, evidencing that this MFP participates in the active efflux of antimicrobials.

Finally, the last efflux system detected in all isolates used in this study was *amvA* belonging to the MFS family. Such a system has the ability to expel fluorquinolones, erythromycin and novobiocin from the bacterial cell, which may justify the high MIC values for ciprofloxacin in *A. baumannii* isolates used in this study. The analysis to evaluate the ability of this system to remove antimicrobials is very similar to those described previously. Rajamohan and collaborators (2010) [28] used a clinical isolate of *A. baumannii*, carrying the

gene *amvA*, to create a mutant strain, lacking this gene. Antimicrobial susceptibility tests were performed in both isolates (wild-type and mutant) and, as expected, MIC values for ciprofloxacin, erythromycin, norfloxacin, and novobiocin were higher to the isolate that possessed the *amvA* gene when compared to the mutant isolate exhibiting the deletion of this gene, making clear the role of mediation of the *amvA* gene in microbial resistance.

Hence, the data obtained and analyzed during this research, we concluded that efflux systems may contribute to the increase of antimicrobial resistance in clinical isolates of *A. baumannii*, noting that other mechanisms can act simultaneously with these systems - such as beta-lactamase enzymes, carbapenemases, permeability changes or loss of porins and mutations in determinant regions of quinolone resistance (QRDR) - further increasing resistance rates in these isolates, facilitating the establishment of infection and making it difficult to treat patients.

Acknowledgments

We thank the staff at the microbiology sector – Centro Integrado de Análises Clínicas (CIAC), for their assistance in isolating and classifying clinical samples; and the staff of the Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz, for their help in genomic sequencing. We declare that we have no conflict of interest. This study was approved by the Human Research Ethics Committees of Pernambuco Cancer Hospital (CAAE 05554812.7000.5205).

References

- [1] **Prashanth K, Badrinath S.** Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2006; 24:39-44.
- [2] **Nwadike VU, Ojide CK, Kalu EI.** Multidrug resistant *Acinetobacter* infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a Nigerian Tertiary Hospital ICU. *Afr. J. Infect. Dis* 2014; 8:14-18.
- [3] **Al-Otaibi FE, Bukhari EE, Badr M, Alrabiaa AA.** Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy. *Saudi Med J* 2016; 37:979-84.
- [3] **Jácome PR, Alves LR, Jácome-Júnior AT, Silva MJ, Lima JL, et al.** Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol* 2016; 65:658-65.
- [4] **Falagas ME, Mourtzoukou EG, Polemis M, Vatopoulos AC, Greek System For Surveillance Of Antimicrobial Resistance.** Trends in antimicrobial resistance of

Acinetobacter baumannii clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13:816-819.

[5] **Maragakis LL, Perl TM.** *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:1254-1263.

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

[7] **Deris ZZ, Harun A, Omar M, Johari MDR.** The prevalence and risk factors of nosocomial *Acinetobacter* blood stream infections in tertiary teaching hospital in north-eastern Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2009; 26:123–129.

[8] **Kumar SH, De AS, Baveja SM, Gore MA.** Prevalence and Risk Factors of Metallo β -lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in Burns and Surgical Wards in a Tertiary Care Hospital. *J. Lab. Physicians* 2012; 4:39-42.

[9] **Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, et al.** Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006; 2:62-72.

[10] **Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J.** Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother* 2007; 59:1210-1215.

[11] **Coyne S, Courvalin P, Périchon B.** Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2011; 55:947-953.

[12] **Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz De Alegría C, Fernández-Cuenca F, et al.** Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5247-57.

[13] **Lin M-F, Lin Y-Y, Tu C-C, Lan C-Y.** Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2015.

[14] **CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (January 2015). *CLSI document M100-S25* 2015; 35.

[15] **Pongas G, Hamilos G, Rolston KV, Kontoyiannis DP.** Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center (1998–2008): diverse and impactful. *Supportive Care in Cancer* 2012; 20:261–265.

[16] **Chaudhary M, Payasi A.** Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β -lactams. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2014; 7:S217-23.

- [17] **Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Lira C, Santos-Junior BJ, et al.** Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in Northeastern Brazil. *Rev Panam Infectol* 2014; 16:174–179.
- [18] **Biglari S, Hanafiah A, Mohd-Puzi S, Ramli R, Rahman M, et al.** Antimicrobial resistance mechanisms and genetic diversity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a teaching hospital in Malaysia. *Microb Drug Resist* 2016.
- [19] **Djuric O, Jovanovic S, Stosovic B, Tosic T, Jovanovic M, et al.** Antimicrobial resistance of selected invasive bacteria in a tertiary care center: results of a prospective surveillance study. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10:1325-1331.
- [20] **Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T, Abe M,** an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4362-4.
- [21] **Hu WS, Yao SM, Fung CP, Hsieh YP, Liu CP, et al.** An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3844-52.
- [22] **Lee Y, Yum JH, Kim CK, Yong D, Jeon EH, et al.** Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla_{OXA-66}* gene. *Ann Clin Lab Sci* 2010; 40:43-8.
- [23] **De Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CRDS, De Lima Campos T, Rezende AM, et al.** High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61.
- [24] **Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3375-3380.
- [25] **Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P.** AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:557-562.
- [26] **Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B.** Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4389-93.
- [27] **Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Marcon M, Gebreyes WA.** Molecular cloning and functional characterization of two novel membrane fusion proteins in conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:499-504.

- [28] **Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA.** Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1919-25.

APÊNDICE B – Artigo 2 em inglês

Title: Occurrence of virulence genetic determinants and resistance in sensitive clinical isolate of *Acinetobacter nosocomialis*

Authors: Lilian Rodrigues Alves¹; Carina Mendes Marques²; Danilo Elias Xavier²; Antônio Mauro Rezende²; Nilma Cintra Leal²; Ana Catarina de Souza Lopes¹; Maria Amélia Vieira Maciel¹

1 Universidade Federal de Pernambuco

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz/PE

MSc. Lilian Rodrigues Alves* (*Corresponding author)

Departamento de Medicina Tropical

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife, PE.

Brazil 50.732-970

e-mail: lilianalves88@hotmail.com

Tel.: +55 81 21268526

Fax: +55 81 21268527

Abstract

Acinetobacter species have a remarkable ability to form biofilms on biotic and abiotic surfaces, and easily acquire resistance to the most diverse antimicrobials. Such skills facilitate the spread of infections in a hospital environment. Several studies were carried out to investigate virulence and resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. multidrug resistant. Sensitive isolates have always been forgotten, because they are not in immediate danger. In this study we investigated virulence and resistance determinants in a clinical isolate of *Acinetobacter nosocomialis*. from a blood culture of a neutropenic patient in treatment for cancer. The analyzes were made through genomic sequencing and it was possible to detect genes involved in the adhesion and formation of biofilms, in addition to antibiotic resistance genes. Therefore, sensitive isolates possess in their genome derterminants of virulence and resistance, which can be expressed at any time by changing the course of infection and the treatment of the patient.

Keywords: *Acinetobacter* spp.; virulence, resistance; genomic sequencing.

Introduction

Acinetobacter species are strict aerobic Gram-negative, non-motile, non-fermenting bacteria that adapt to hostile environments, frequently associated with adherence and biofilm formation on biotic or abiotic surfaces. This process contributes to the microorganism dispersal in the hospital environment, thus leading to healthcare-associated infections (HAIs) (WISPLINGHOFF et al., 2007; PELEG et al., 2008; DOUGHARI et al., 2011).

A remarkable characteristic of this pathogen is the rapid resistance development as a consequence of the selective pressure by antimicrobial agents, which favors the emergence of resistant isolates and limits the therapeutic options available (FALAGAS et al., 2007; NWADIKE et al., 2014).

The search for genetic resistance factors such as the production of antimicrobial inactivating enzymes, loss or reduction of porins, and expression of multidrug efflux systems are mostly restricted to multidrug resistant isolates of *Acinetobacter*, whereas the sensitive strains are excluded from the analysis.

Since there is a lack of studies on virulence and resistance determinants in sensitive clinical isolates of *Acinetobacter* spp., the aim of this study was to perform genome sequencing and detection of virulence and antimicrobial resistance determinants in a sensitive strain of *A. nosocomialis*, isolated from a neutropenic patient.

Materials and Methods

Bacterial isolates

The isolate of *A. nosocomialis* was obtained from blood culture of a neutropenic patient hospitalized at a cancer hospital in Recife, Pernambuco, Brazil.

Initially, this isolate was identified by manual biochemical tests and antimicrobial susceptibility profile by disk diffusion.

The isolate of *A. nosocomialis* was transported in a threaded tube containing Casoy Agar to Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (Departamento de Medicina Tropical / UFPE), where it was processed. Next, the isolate was inoculated into brain-heart infusion broth (BHI), incubated at 37 ° C / 24 hours and kept in frozen stock in BHI broth added with 20% glycerol at -20 ° C. To confirm the bacterial species, the identification was performed using the MALDI-TOF technique, in collaboration with the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ/PE.

Antimicrobial susceptibility profile

After analysis of the purity of *A. nosocomialis* isolate, the microdilution broth method was performed according to the guidelines by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The following antimicrobials were used: Ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin and polymyxin B. The results were determined by the minimum inhibitory concentration of the antimicrobial agents ($\mu\text{g/mL}$) (CLSI, 2015).

DNA extraction

DNA extraction was performed using the Brazol kit (LGC-Biotechnology), according to the protocol provided by the manufacturer. The bacterial DNA was quantified and subsequently stored at -20°C .

DNA library construction and genome sequencing

DNA library construction was performed using the Nextera XT kit (Illumina). The quantification of the libraries was performed by Real-Time PCR using the Library Quantification Kit (Illumina) and 7500 equipment (Applied BioSystems). Genome sequencing was performed using paired-end and data were generated on MiSeq platform (Illumina) and MiSeq Reagent kit v3 600-cycle (Illumina).

Genome sequencing assembly and annotation

Initially, the quality of the fragments was analyzed using the FASTQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Low-quality sequences were examined and then trimmed by Trimmomatic v 0.32. Subsequently, the contigs were assembled using the *velveth* and *velvetg* programs, as well as VelvetOptimiser. (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). Prokka and VFDB were used for protein prediction and annotation. Contigs were alignment and reordered by the Mauve program. All data related to assembly, prediction and annotation of coding genes were stored in a relational database using MySQL.

Results

The antimicrobial phenotypic susceptibility test revealed a complete sensitivity profile (Table 1).

Table 1: Antimicrobial susceptibility profile in clinical isolate of *Acinetobacter nosocomialis* (Acb_11/48) by broth microdilution

Antimicrobial	MIC (µg/mL)	Interpretation
Ampicilin/Sulbactam	≤ 1/0,5	S
Ceftriaxone	8	S
Ceftazidime	≤ 1	S
Cefepime	≤ 1	S
Imipenem	≤ 0,5	S
Meropenem	≤ 0,5	S
Ciprofloxacin	≤ 0,25	S
Levofloxacin	≤ 0,25	S
Amikacin	≤ 2	S
Gentamicin	≤ 0,5	S
Polymyxin B	2	S

Note: Acb = *Acinetobacter*; MIC = minimum inhibitory concentration; S = sensitive

The genome sequencing of this sensitive clinical isolate of *Acinetobacter nosocomialis* revealed the presence of genes encoding virulence and resistance factors (table 2).

Table 2: Resistance and virulence genes present in *Acinetobacter nosocomialis* (Acb_11 / 48) determined by genomic sequencing

Genes	Description
<u>Resistance</u>	
<i>bla</i> _{ADC-25}	<i>Acinetobacter</i> -derived cephalosporinase
<i>strA/strB</i>	Aminoglycoside phosphotransferase
<i>sul2</i>	Resistance to sulfonamides
AdeFGH	Multi-drug efflux system
AdeIJK	Multi-drug efflux system
<u>Virulence</u>	

<i>pilQ/pilP/pilO/pilN</i>	Operon involved in <i>pili</i> type IV biogenesis
<i>pilT</i>	ATPase; contraction/motility proteins (<i>pili</i> type IV)
<i>bfmR</i>	TCS; regulates biofilm formation and participates in cell adhesion
<i>bfmS</i>	TCS; regulates biofilm formation and participates in cell adhesion
<i>csuA</i>	Biofilm formation
<i>csuB</i>	Biofilm formation
<i>csuC</i>	Biofilm formation
<i>csuD</i>	Biofilm formation
<i>csuE</i>	Biofilm formation

Note: Acb = *Acinetobacter*; TCS = two-component system

Discussion

The pathogenicity mechanisms of *Acinetobacter* species are not yet very clear. However, virulence factors, including the outer membrane protein A, phospholipase D, biofilm-associated proteins, pilus, and siderophores are necessary for colonization and infection (HARDING et al., 2013). In our study, we detected genes associated with colonization and establishment of infection, for example, pilus and biofilm formation.

Protein filaments called pili mediate adherence of bacteria of genus *Acinetobacter* to biotic or abiotic surfaces and, consequently, facilitates biofilm formation and increase bacteria ability to survive in adverse environmental conditions (KRÖGER et al., 2017). Type IV pilus is composed of monomers of protein pilin, encoded by *pilA* gene. The assembly of this pilus requires two ATPases, *pilB* and *pilT* (TAN et al., 2014). It was not possible to detect the presence of the *pilA* gene in our isolate, but the presence of an operon (*pilQPON*) linked to the synthesis of pilus type IV and the presence of ATPase *pilT* was detected. Some authors, such as Harding and collaborators (2013), affirm that the role of pilus type IV in adhesion and biofilm formation is still uncertain, even though it has observed that *Acinetobacter baumannii* is able to produce pilus type 4 functional. Hence, further studies are necessary to elucidate the participation of this structure virulence in *Acinetobacter*.

Other pili detected in our study was the *csuA/ABCDE* assembly system regulated by the two-component system (TCS) *bfmRS*, also detected. This system is evolved in the formation of biofilms on biotic and abiotic surfaces, allowing bacteria of the genus *Acinetobacter* to survive unfavorable conditions (KRÖGER et al., 2017). However, it is still unclear whether *csuA/ABCDE* is required for adhesion to host tissue. De Breij and collaborators (2009)

demonstrated that the presence of this system in *A. baumannii* was not involved in adhesion to human epithelial cells. Liou and collaborators (2014) observed a deficiency in adhesion of *A. baumannii* to human alveolar epithelial cells, after deletion of *bfmS*, the regulatory gene of this system.

Regarding the resistance factors, the *bla*_{ADC-25} gene was detected in our sensitive isolate. This cephalosporinase is a type of AmpC β -lactamase and confers resistance to penicillins, cephamycins and cephalosporins, except to cefepime. Inhibitors of β -lactamase appear to have no action on this type of enzyme, except tazobactam that exhibited inhibitory activity against *Morganella morganii* (PÉREZ et al., 2014). Liu and Liu (2015) determined the antimicrobial resistance prevalence associated with β -lactamases, AmpC type enzymes, in clinical isolates of *A. baumannii*, obtained from a tertiary hospital in China. Of 134 isolates, 96 extended-spectrum β -lactam resistant isolates produced AmpC and ADC. In 2006, study by Zhao and collaborators (2007) analyzed the presence of *bla*_{ADC} in isolates of *A. baumannii*, obtained from children admitted to a pediatric clinic. Of 28 isolates, 17 harbored *bla*_{ADC} gene and most of them did not present a multidrug resistant phenotype. It is worth noting that part of isolates from the studies mentioned previously did not present the gene encoded for ADC enzyme, raising questions whether this enzyme should be considered intrinsic. On the other hand, Sarhaddi and collaborators (2016) found *bla*_{ADC} gene in all 54 multidrug resistant isolates of *A. baumannii* from a burn center in Iran. The presence of this gene in our sensitive isolate is an alert, since at any moment it could be expressed and modify its susceptibility profile for β -lactam resistance.

The resistance genes to sulfonamides (*sul2*) and aminoglycosides (*strA/ strB*), detected in our isolate, have been reported on mobile genetic elements, as plasmids (HAMIDIAM et al., 2016; HAMIDIAN; HALL, 2016). The gene *sul2* was found next to a transposase, indicating that this gene is inserted into a mobile genetic element.

In addition to the resistance genes described, the presence of the multidrug efflux systems of the RND family (AdeFGH and AdeIJK) was detected in the sensitive isolate of *A. nosocomialis*. These systems together confer resistance to β -lactams, chloramphenicol, tetracyclines, trimethoprim, fluoroquinolones, erythromycin, lincosamides, tigecycline, novobiocin, rifampicin and other compounds such as dyes and anionic detergents (COYNE et al., 2010; COYNE et al., 2011). In accordance with Gordon and Wareham (2010), efflux systems remove antimicrobials only when activated or overexpressed. This may explain the absence of multidrug resistance profile of the studied isolate, but highlights that hostile environment can cause resistance genes to become expressed in a strain with previously sensitivity profile.

From the data obtained in this study, we concluded that virulence factors present in the sensitive clinical isolate of *A. nosocomialis* may contribute to the colonization, infection, and maintenance of this microorganism in the hospital environment. Another fact that is worth highlighting is the presence of resistance mechanisms, not restricted to resistant multidrug isolates, but which in our isolate are probably not being expressed by the action of repressor genes. The presence of these genes may confer a selective advantage on these microorganisms which, when exposed to unfavorable situations, such as the use of antimicrobials in inadequate dosages or for time, can express resistance genes as a form of defense and in response to a hostile environment. The presence of resistance genes is not restricted to multidrug resistant strains; however, it may be present, but not expressed, in sensitive isolates. Additionally, bacteria may share mobile genetic elements that contribute to increase of multidrug resistant strains circulating in the hospital facilities. Hence, an infection caused by a sensitive strain still requires special attention, once several resistance genes can be harbored and potentially be expressed, thus interfering in the clinical outcome of the patient.

Acknowledgments

We thank the staff at the microbiology sector – Centro Integrado de Análises Clínicas (CIAC), for their assistance in isolating and classifying clinical samples; and the staff of the Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz, for their help in genomic sequencing. We declare that we have no conflict of interest. This study was approved by the Human Research Ethics Committees of Pernambuco Cancer Hospital (CAAE 05554812.7000.5205).

References

- Wisplinghoff H, Schmitt R, Wohrmann A, Stefanik D, Seifert H. (2007) Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Hosp Infect 66:174-181. doi: 10.1016/j.jhin.2007.02.016
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21: 538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07
- Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. (2011) The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. Microbes Environ 26:101-112. doi: 10.1264/jsme2.ME10179
- Falagas ME, Mourtzoukou EG, Polemis M, Vatopoulos AC, Greek System for Surveillance of Antimicrobial Resistance. (2007) Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter*

baumannii clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. Clin Microbiol Infect 13: 816-819. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01761.x

Nwadike VU, Ojide CK, Kalu EI. (2014) Multidrug resistant *Acinetobacter* infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a Nigerian Tertiary Hospital ICU. Afr. J. Infect. Dis 8:14-18.

Harding CM, Tracy EM, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson-Jr RS. (2013) *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. MBio 4. doi: 10.1128/mBio.00360-13.

Kröger C, Kary SC, Schauer K, Cameron ADS. (2017) Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. Genes (Basel) 8. doi: 10.3390/genes8010012

Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lau GW. (2014) Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. J Innate Immun 6: 227–239. doi: 10.1159/000354304

De Breij A, Gaddy J, Van Der Meer J, Koning R, Koster A, Van Den Broek P, Actis L, Nibbering P, Dijkshoorn L. (2009) *CsuA/BABCDE*-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Res. Microbiol 160:213–218. doi: 10.1016/j.resmic.2009.01.002

Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. (2014) The sensor kinase *bfmS* mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Immunol Infect 47:275–281. doi: 10.1016/j.jmii.2012.12.004

Pérez A, Pérez-Llarena FJ, García P, Kerff F, Beceiro A, Galleni M, Bou G. (2014) New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* spp. affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. J Antimicrob Chemother 69:2407-11. doi: 10.1093/jac/dku163

Liu Y, Liu X. (2015) Detection of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in the Xuzhou region and analysis of drug resistance. Exp Ther Med 10: 933-936. doi: 10.3892/etm.2015.2612

Zhao RZ, Chen Q.; Zheng YJ, Mi ZH. (2007) Identification of a new subtype of *bla*_{ADC} produced by *Acinetobacter baumannii* isolated in children. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 28: 1009-12.

- Sarhaddi N, Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Dolatabadi S, Salimizand H, Amel-Jamehdar S. (2016) Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn centre of northeast Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 8:60-66. doi: 10.1016/j.jgar.2016.10.009
- Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. (2010) Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4389-93. doi: 10.1128/AAC.00155-10
- Coyne S, Courvalin P, Périchon B. (2011) Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 55:947-953. doi: 10.1128/AAC.01388-10
- Gordon NC, Wareham DW. (2010) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 35: 219–226. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024
- Hamidian M, Ambrose SJ, Hall RM. (2016) A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the sul2 sulphonamide and strAB streptomycin resistance genes. *Plasmid* 87-88:43-50. doi: 10.1016/j.plasmid.2016.09.001
- Hamidian M, Hall RM. (2016) The resistance gene complement of D4, a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, resides in two genomic islands and a plasmid. *J. Antimicrob. Chemother* 71:1730–1732. doi: 10.1093/jac/dkw041

ANEXO A – Parecer Comissão de Ética e Pesquisa (CEP)

SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER- SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO PROVENIENTES DE PACIENTES DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

Pesquisador: PAULO SERGIO RAMOS DE ARAÚJO

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 05554812.7.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 118.131

Data da Relatoria: 09/10/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a diversidade microbiológica e genética de isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. dos pacientes do Hospital do Câncer de Pernambuco

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há qualquer risco à integridade dos sujeitos participantes desta pesquisa

Benefícios:

Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco assim como a diversidade genética e seu papel na disseminação intrahospitalar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo.- Amostras Clínicas: As amostras clínicas obtidas dos pacientes serão processadas no laboratório referência do HCP (CIAC), e as informações a respeito das características dos pacientes serão coletadas através da consulta de prontuários, com objetivo de obter informações a respeito de antibioticoterapia e uso de dispositivos invasivos, por exemplo.- Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra: As amostras dos pacientes serão coletadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizados no HCP para ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida operatória e secreções diversas. . Desta forma, a pesquisa visa atingir todos os isolados bacterianos que forem identificados como *Staphylococcus* spp., espécies de *P. aeruginosa*, oriundas dos setores do HCP no período de julho de 2012 a dezembro de 2012.-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento está adequado

Recomendações:

Projeto aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi aprovado após a realização das alterações solicitadas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217--8197

Fax: (813)217--8197

E-mail: cep@hcp.org.br

ANEXO B – Artigo publicado durante o doutorado

Journal of Medical Microbiology (2016), 65, 1–8

DOI 10.1099/jmm.0.000280

Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections

Paula Regina Luna de Araújo Jácome,¹ Lílian Rodrigues Alves,¹
Agenor Tavares Jácome-Júnior,² Maria Jesuíta Bezerra da Silva,³
Jailton Lobo da Costa Lima,¹ Paulo Sérgio Ramos Araújo,^{1,4}
Ana Catarina S. Lopes¹ and Maria Amélia Vieira Maciel¹

Correspondence

Paula Regina Luna de Araújo
Jácome
paulajacome83@gmail.com

¹Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

²Faculdade ASCES – Laboratório de Microbiologia, Bromatologia e Análise de Água, Av. Portugal, 584 – Bairro Universitario, Caruaru-PE 55016-400, Brazil

³Centro Integrado de Análises Clínicas, Avenida Norte Miguel Arraes de Alencar, 2535 – Encruzilhada, Recife – PE 52041-080, Brazil

⁴Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. are three of the pathogens most frequently involved in infections of cancer patients, and the production of β -lactamases is a major mechanism of resistance due to its wide diversity of existing enzymes. Therefore, the aim of the present study was to investigate the microbiological profile and data related to patients and infections, and to search for β -lactamases genes in bacterial isolates from hospitalized cancer patients in a hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. A total of 169 isolates were recovered between 2012 and 2014, of which 58 were *P. aeruginosa*, 36 were *Acinetobacter* spp. and 75 were *Klebsiella* spp. A high percentage of carbapenem resistance was observed in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Among the carbapenem-resistant bacteria, the *bla*_{SPM-1} gene was detected in *P. aeruginosa* (35.5%) and *Acinetobacter* spp. (3.8%), while *bla*_{KPC} was detected in *P. aeruginosa* (25.8%) only. Among the third- and fourth-generation cephalosporin-resistant strains, in *Klebsiella* spp. we detected the genes *bla*_{TEM} (30.6%), *bla*_{CTX-M} (58.3%) and *bla*_{KPC} (5.6%), and in *Acinetobacter* spp. only *bla*_{TEM} (25.9%). This is the first report of an *Acinetobacter baumannii* *bla*_{SPM-1} gene carrier that has been isolated in Brazil. The most frequent cancer types were bowel tumour [14.8%; 95% confidence interval (CI_{95%}) 9.8–21.1%], breast cancer (13.6%; CI_{95%} 8.8–19.7%) and prostate cancer (11.2%; CI_{95%} 6.9–17.0%). These results therefore provide knowledge of susceptibility profile and resistance mechanisms and thus can contribute to the strategic formulation of hospital infection control plans and the rational use of antimicrobials, reducing mortality from infection levels in cancer patients.

Received 2 December 2015
Accepted 13 May 2016

INTRODUCTION

Bacterial infections have been indicated as a significant cause of mortality and morbidity among cancer patients, with or without neutropenia, despite advances in antibiotic therapy in recent decades (Wang *et al.*, 2011; Pongas *et al.*, 2012). The

Abbreviations: HAI, hospital-acquired infection; MDR, multidrug resistance.

GenBank accession number: KR185964