



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BELISA AVILA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Porto Alegre
2016

BELISA AVILA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Porto Alegre

2016

Ficha Catalográfica

R696c Rodrigues, Belisa Avila

Caracterização de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos de *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* / Belisa Avila Rodrigues . – 2016.

65 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira.

1. *Acinetobacter*. 2. gene blaOXA-23. 3. oxacilinas. 4. integrons. 5. polimixina B. I. Oliveira, Sílvia Dias de. II. Título.

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

BELISA AVILA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovado em: 29 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Ana Paula Guedes Frazzon

Eliane Santarém

Simone Simionatto

Porto Alegre

2016

Agradecimentos

Aos meus pais, Serafim e Elisa por tornarem possível mais essa conquista, assim como todo o apoio e compreensão em todas as etapas. Ao meu irmão, Serafim Rodrigues Junior, por estar presente nos momentos mais difíceis, pela paciência e conselhos dados.

À minha orientadora, Dra. Sílvia Dias de Oliveira pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela paciência, ensinamentos e conhecimentos trocados que proporcionaram o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos demais professores do Laboratório, prof. Dra. Marjo Cadó Bessa, prof. Dra. Renata Medina e prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pelas ideias e conhecimentos compartilhados.

À Me. Stephanie Gallo, por toda a ajuda e ensinamentos fornecidos desde meu primeiro dia no laboratório, pela amizade e por todas as palavras de carinho e tranquilidade, e sem a qual esse trabalho não seria possível.

À Bruna Kern Donamore pela parceria, apoio incondicional, amizade, conhecimentos compartilhados e inspiração.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia pelo apoio e amizade, em especial Bruna Leal, Maria Cláudia Garcia e Ana Paula Rauber.

Ao Valdir Barth Junior e Fernanda Macchi, pela amizade e por todos os conhecimentos trocados antes mesmo deste trabalho, mas que tiveram grande importância na realização do mesmo.

Aos meus amigos Rúbens Zaltron e Vanessa Engers por tornarem a minha vida mais leve e compreenderem todas as ausências e a todos os demais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii (ACB) são patógenos oportunistas responsáveis por infecções do trato respiratório, infecções de feridas e bacteremia em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Esses microrganismos tornaram-se um problema nas unidades de assistência à saúde devido à sua capacidade de adquirir e acumular determinantes de resistência a antimicrobianos, sendo responsáveis por altas taxas de resistência aos principais antimicrobianos utilizados terapêuticamente. Desta forma, esse estudo teve por objetivo determinar a suscetibilidade a antimicrobianos, assim como detectar determinantes de resistência em isolados clínicos de ACB. Para isso, foram utilizados 200 isolados clínicos, resistentes aos carbapenêmicos, pertencentes ao complexo ACB, coletados de um hospital em Porto Alegre, Brasil, no período de janeiro de 2012 a maio de 2015. Para determinar a suscetibilidade a antimicrobianos, 16 fármacos foram utilizados na técnica de disco-difusão, assim como foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina B e meropenem por meio da técnica de microdiluição em caldo. Adicionalmente, a CIM para polimixina B foi determinada em 17 isolados, empregando diferentes métodos em comparação com a microdiluição em caldo, adotada como referência. Os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}, bem como os integrons de classe 1 e 2 foram detectados por PCR. Um total de 82,5% dos isolados foram *extremely resistant* (XDR) e 17,5% foram *multidrug resistant* (MDR). Quarenta e seis padrões de não-suscetibilidade foram encontrados entre os isolados, sendo que polimixinas, tetraciclinas e aminoglicosídeos foram as classes com maior

taxa de suscetibilidade. Na determinação de CIM para polimixina B com diferentes métodos, *very major errors* e *major errors* foram encontrados em E-test, e *major errors* em diluição em ágar, quando comparados com o método de referência. A microdiluição em caldo suplementado com polissorbato 80 mostrou redução de duas ou mais diluições na maioria dos isolados (82,3%). Os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} foram encontrados em 100% dos isolados, enquanto 49% apresentaram *bla*_{IMP}. O gene *bla*_{NDM} não foi encontrado nos isolados analisados. Integrons de classe 1 foram encontrados em 68% dos isolados e integrons de classe 2 em 88%. O elevado percentual de isolados XDR, assim como a detecção de importantes determinantes de resistência e a alta taxa de integrons encontrada, reforçam a preocupação com microrganismos do complexo ACB e sua disseminação nas unidades de assistência à saúde.

Palavras-chave: *Acinetobacter*; gene *bla*_{OXA-23}; oxacilinasas; integrons; polimixina B.

Abstract

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii (ACB) are opportunistic pathogens responsible for respiratory tract infections, wound infections, and bacteremia in intensive care units patients. These microorganisms became a problem in health care units due to their ability to acquire and accumulate resistance determinants. They are resistant to important antibiotics commonly used to treat infections caused by them. Thus, this study aimed to determine the antimicrobial susceptibility and detect resistance determinants in clinical ACB isolates. For this, 200 clinical ACB isolates, resistant to carbapenems, were collected from a hospital in Porto Alegre, Brazil. To determine susceptibility to antimicrobial agents, 16 antimicrobials were used in the disk diffusion technique and the minimum inhibitory concentration (MIC) for polymyxin B and meropenem was performed by broth microdilution. Additionally, MIC for polymyxin B in 17 isolates was determined using different methods in comparison with broth microdilution, adopted as reference method. The presence of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM}, as well as class 1 and 2 integrons, were detected by PCR. A total of 82.5% were extremely resistant (XDR) and 17.5% were multidrug resistant (MDR). Forty-six non-susceptibility patterns were found among the isolates, with polymyxins, tetracyclines, and aminoglycosides being the classes with higher rate of susceptibility. When different methods to determining MIC for polymyxin B were evaluated, very major errors and major errors were found in E-test and major errors in agar dilution, as compared with the reference method. The broth microdilution with polysorbate 80 showed a reduction of two or more dilutions in most isolates (82.3%). The *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes were found in 100% of the isolates, while 49% harbored *bla*_{IMP}. The *bla*_{NDM} gene was not found in any isolate. Class 1 and class 2 integrons were found in 68% and 88% of the isolates, respectively. The high percentage of XDR isolates, as well as the detection of important resistance determinants and the high rate of integrons found, reinforce the concern regarding ACB microorganisms and their spread in health care units.

Keywords: *Acinetobacter*; *bla*_{OXA-23} gene; oxacilinases; integrons; polymyxin B.

LISTA DE ABREVIações

- ACB** – *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CA** – *Categorical agreement*
- CHDLs** – Enzimas hidrolisantes de carbapenêmicos
- CIM** – Concentração inibitória mínima
- CLSI** – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- EA** – *Essential agreement*
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- ESBLs** – β -lactamases de espectro estendido
- GES** – *Guiana extended spectrum β -lactamase*
- IMP** – Imipenemase
- KPC** – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- MALDI-TOF MS** – *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*
- MBL** – Metalo- β -lactamases
- MDR** – *Multidrug resistant*
- ME** – *Major error*
- NDM** - *New Delhi* metalo-beta-lactamase
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- OXAs** – Oxacilinases
- PBPs** – Proteínas ligantes de penicilinas
- PDR** – *Pandrug-resistant*
- PER** – *Pseudomonas extended resistance*
- SIM** – Seul imipenemase
- UTIs** – Unidades de terapia intensiva
- VEB** – *Vietnamese extended-spectrum β -lactamase*
- VIM** – Verona imipenemase
- VME** – *Very major error*
- XDR** – *Extensively drug-resistant*

Sumário

Capítulo 1	11
1.1 Introdução.....	12
1.2 Objetivos	23
1.2.1 Objetivo Geral	23
1.2.2 Objetivos Específicos	23
Capítulo 2	24
2.1 Antimicrobial susceptibility and detection of carbapenem resistance determinants in clinical <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex <i>isolates</i>	24
Capítulo 3	25
3.1 Considerações Finais.....	26
Referências.....	30

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

1.1 Introdução

Acinetobacter spp. são identificadas como cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores de açúcares e oxidase negativos (1). Este gênero compreende 43 espécies (2), sendo que as mais importantes clinicamente, devido às similaridades genéticas e fenotípicas, que dificultam a diferenciação, encontram-se agrupadas em um complexo denominado *A. calcoaceticus-baumannii* (ACB): *A. pittii* (anteriormente denominada genoespécie 3), *A. nosocomialis* (anteriormente genoespécie 13TU), *A. calcoaceticus* e *A. baumannii* (3,4). Dentre os microrganismos pertencentes ao complexo ACB, *A. baumannii* tem se destacado por seu impacto clínico, apesar das espécies *A. pittii* e *A. nosocomialis* também serem responsáveis por causar infecções em humanos e carrear resistência a antimicrobianos. Entretanto, *A. calcoaceticus* é considerado um microrganismo ambiental (1,5). Desta forma, a identificação correta dessas espécies é de relevância e tem sido bastante difícil devido às similaridades com os outros membros do complexo ACB e aos laboratórios clínicos geralmente utilizarem métodos fenotípicos com este propósito (4).

As alternativas para a identificação desses microrganismos têm se baseado em métodos moleculares, tais como o sequenciamento do gene RNAr 16S, que apresenta limitações por este gene ser bastante conservado para identificar todas as espécies de *Acinetobacter*; o sequenciamento parcial do gene *rpoB*; e a multiplex PCR tendo como alvo diferentes segmentos do gene *gyrB* (6–8). A espectrometria de massas, MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*) também vem

sendo cada vez mais explorada para a identificação dos membros do complexo ACB, tendo apresentado resultados satisfatórios (9,10). Estudo realizado por Sousa et al. (11) mostrou que MALDI-TOF MS combinada a ferramentas quimiométricas foi capaz de identificar as espécies do complexo ACB com sucesso. O espectrômetro Vitek MS *plus* atualmente é utilizado para a identificação de bactérias, porém os bancos de dados que ele possui não permitem a identificação dos microrganismos do complexo ACB. Com isso, Pailhoriès et al. (12) criaram um banco de dados para utilizar junto ao Vitek MS *plus* que permite a identificação de três espécies do complexo ACB, porém ainda não está validado para uso em diagnóstico clínico.

O complexo ACB tornou-se um motivo de preocupação mundial nas unidades de saúde, sendo responsável pelo aumento de morbidade e mortalidade de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (13). Estes microrganismos sobrevivem por longos períodos no ambiente hospitalar, especialmente pela sua sobrevivência ao dessecamento e capacidade de formar biofilme, o que favorece novas infecções (14,15). Muitos fatores de risco para a infecção por esses patógenos têm sido descritos, tais como excesso de manipulação pós cirurgia; uso de cateter intravascular, ventricular ou urinário e tubos endotraqueais; procedimentos invasivos realizados por longos períodos e exposição a antimicrobianos de alto espectro (16). Sendo assim, estes microrganismos são considerados patógenos oportunistas responsáveis por causar infecções do trato respiratório, como quadros de pneumonias associadas à ventilação mecânica, infecções de feridas e bacteremia, principalmente em pacientes internados em UTIs (1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é estimado que *A. baumannii* seja a causa de 2% a 10% de todas as infecções causadas por bactérias Gram-negativas nos Estados Unidos e na Europa (17). Segundo boletim da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2014, *Acinetobacter* spp. foram responsáveis por 12,9% das bacteremias associadas a cateter em pacientes adultos internados em UTIs (18). Outro estudo realizado pelo *Brazilian SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance)*, onde foram avaliados casos de bacteremia em regiões diferentes do Brasil, *Acinetobacter* spp. foram o quarto patógeno mais encontrado, com um percentual de 11,4% (19). *Acinetobacter* spp. também têm sido implicadas em bacteremia em pacientes que passaram por transplante de órgãos (20,21). Bacteremia em pacientes com câncer hematológico também tem sido descrita, até mesmo causada por isolados com altas taxas de resistência a antimicrobianos (22,23). No sul do Brasil, no ano de 2011, a prevalência de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos em bacteremia foi de 17,3%; 10,6% em infecção de sítio cirúrgico; 34,5% em pneumonia, e 17,7% em infecções do trato urinário (24).

Os quadros de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. são ainda agravados pela capacidade destes microrganismos em adquirir facilmente determinantes de resistência, o que possibilita o desenvolvimento de isolados resistentes aos principais antimicrobianos utilizados na terapia contra infecções causadas por esses patógenos (25). A aquisição de determinantes de resistência nestes microrganismos deve-se à sua suscetibilidade a modificações genéticas, incluindo aquelas proporcionadas pela transferência

de plasmídeos e transposons, o que pode ser potencializado quando estes elementos carregam integrons (26).

Os integrons são elementos genéticos móveis que têm a capacidade de capturar genes, sendo caracterizados pela presença de três elementos: um gene que codifica para uma integrase (*intl*), um sítio de recombinação (*attI*) e um promotor (P) (27). Dentre as diversas classes de integrons descritas, três delas são mais encontradas em isolados clínicos (classes 1, 2 e, mais raramente, a 3) (28). Os integrons de classe 1 são os mais encontrados em bactérias Gram-negativas, sendo bastante prevalentes em *Acinetobacter* spp. Esta classe de integrons possui uma estrutura contendo regiões 5' e 3' conservadas e uma região variável. Na região 5' conservada se encontra a integrase 1 e o sítio de recombinação; a região variável é composta por diferentes cassetes gênicos; e a região 3' conservada apresenta, comumente, o gene *qacEΔ1* e o gene *suI1*, que codificam para resistência aos compostos quaternários de amônia e às sulfonamidas, respectivamente. Dentre os diferentes cassetes gênicos encontrados na região variável, os mais prevalentes, em *Acinetobacter* spp., têm sido relacionados à resistência a aminoglicosídeos e ao trimetoprim. Além disso, a região variável dessa classe de integrons encontrada em isolados clínicos também pode carrear genes que codificam para as principais metalo-β-lactamases (MBLs; associadas à resistência a β-lactâmicos) (29).

Os integrons de classe 2 estão associados à família do transposon Tn7, contendo um sítio de recombinação *attI2* e um promotor Pc. A integrase 2 apresenta uma identidade menor do que 50% com a integrase 1, e não apresenta funcionalidade devido à presença de um códon interno de parada

(30). A região conservada 3' contém os genes *tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* e *tnsE*, responsáveis pela mobilidade deste integron através da inserção preferencial em um único local no cromossomo bacteriano (31). Além dos genes supracitados, o integron de classe 2 carrega cassetes gênicos, que incluem mais comumente os genes *dfrA1*, *sat1* e *aadA1*, que são determinantes de resistência ao trimetoprim, estreptotricina e estreptomina/espectinomicina, respectivamente (30). Integrons de classe 2 são menos prevalentes que os de classe 1, sendo que a maior incidência dessa classe, em *Acinetobacter* spp., é encontrada na América do Sul (32,33).

Devido ao aumento do número de casos de infecções causadas por cepas resistentes a inúmeros antimicrobianos, surgiu a necessidade de uma classificação dos microrganismos de acordo com seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Entretanto, existe uma grande variabilidade nos critérios adotados para definir resistência a múltiplos fármacos (34). Atualmente, os critérios propostos por Magiorakos et al. (35) têm sido bastante utilizados em estudos com microrganismos do complexo ACB (6,36–38). Essa classificação divide os isolados em três grupos, avaliando a não suscetibilidade frente a diversos agentes antimicrobianos separados em nove categorias. Define-se como MDR (resistente a múltiplos fármacos) os isolados não suscetíveis a um ou mais antimicrobianos em três ou mais categorias, XDR (extensivamente resistentes a fármacos) quando forem suscetíveis a duas ou menos categorias de antimicrobianos, e PDR (pan-resistentes a fármacos) quando não foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.

Dentro deste contexto, o tratamento das infecções causadas pelo complexo ACB é considerado um desafio para a clínica médica e vem sofrendo

mudanças ao longo dos anos (39). Desde a década de 1970, foram relatados inúmeros casos associados com cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e cefalosporinas , levando ao uso dos carbapenêmicos. Atualmente, devido à resistência aos carbapenêmicos, as polimixinas e a tigeciclina têm constituído opções terapêuticas nas infecções causadas por *Acinetobacter* spp. (40). Alternativamente, associações de antimicrobianos vêm sendo empregadas em casos de *Acinetobacter* spp. MDR e XDR. Sinergismo entre polimixina e carbapenêmico, colistina e glicopeptídeo, colistina e rifampicina, colistina e minociclina, assim como minociclina e meropenem foi descrito, sendo que as combinações de polimixinas com carbapenêmicos e de polimixinas com rifampicina demonstraram sinergismo até em isolados resistentes às polimixinas (41,42).

Os carbapenêmicos são β -lactâmicos, que atuam ligando-se covalentemente às proteínas ligantes de penicilinas (PBPs) presentes na parede celular bacteriana, impedindo a sua síntese. Como o processo de formação da parede bacteriana envolve constante autólise e síntese de peptidoglicano, apenas a autólise se mantém, enfraquecendo a parede celular e gerando uma ruptura celular por conta da pressão osmótica (43). Entretanto, atualmente, a resistência aos carbapenêmicos é amplamente descrita em vários países, inclusive no Brasil (44,45). Em boletim divulgado pela ANVISA, dos isolados de *Acinetobacter* spp. responsáveis por bacteremias associadas a cateter, 79,3% eram resistentes aos carbapenêmicos no ano de 2014, 80,7% em 2013 e 77,1% em 2012 (18). Desses isolados, em 2014, a região sul foi responsável pela terceira maior taxa de resistência aos carbapenêmicos (77,8%) (18). Em um estudo realizado por um programa de vigilância em

antimicrobianos (SENTRY), na América Latina, foi relatado um aumento nas taxas de resistência ao imipenem, onde na Argentina, as taxas que eram de 6,4% nos anos de 1997-1999 passaram a 84,9% nos anos 2008-2010, o mesmo tendo ocorrido no Brasil (de 12,6% para 71,4%) e no Chile (0,0% para 50%) (46). Outro estudo, em hospitais da cidade de Porto Alegre revelou uma alta incidência de *A. baumannii* MDR (47).

Microrganismos do complexo ACB têm apresentado muitos mecanismos de resistência a antimicrobianos, tais como redução da permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antimicrobianos, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de β -lactamases (25,48). As β -lactamases são as principais enzimas envolvidas em resistência a β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Ambler descreveu a divisão destas enzimas em quatro classes (A, B, C e D), baseando-se nas suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos (49). As β -lactamases da classe A de Ambler, conhecidas como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), caracterizam-se como serina- β -lactamases, hidrolisam cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (50). Relatos de ESBLs em *Acinetobacter* spp. são pouco frequentes se comparados a outras β -lactamases, porém algumas, como GES, VEB, PER e KPC, têm sido descritas nestas espécies (51–54).

As MBLs, ou β -lactamases da classe B de Ambler, contêm íons de zinco em seu sítio ativo, e são mais frequentemente encontradas em *Acinetobacter* spp. do que as de classe A e C. Estas enzimas têm uma forte capacidade de hidrólise de todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam. As MBLs são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mas não são afetadas

pelos inibidores de serina- β -lactamases (ácido clavulânico e tazobactam) (55,56). Apesar de serem produzidas intrinsicamente por microrganismos como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus*, também são identificadas como MBLs adquiridas, já que muitos genes que codificam essas enzimas foram identificados em elementos genéticos móveis e têm sido relatados em microrganismos patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (57–60). Os tipos de MBLs mais importantes clinicamente encontrados em *Acinetobacter* spp. são: IMP (imipenemase) e VIM (Verona imipenemase). O gene *bla_{IMP}* foi detectado pela primeira vez em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, no Japão, em 1991 (59). Já em *A. baumannii*, genes que codificam para IMP-2 foram descritos no ano de 2000, na Itália, fazendo parte de um integron de classe 1 (60). Desde então, a presença de genes que codificam diversos tipos desta enzima, em diferentes países, tem sido relatada (61–65). Enzimas VIM constituem o maior grupo de MBLs encontradas, compreendendo mais de 40 variantes (29). A primeira variante descrita foi VIM-1 em *P. aeruginosa* e, posteriormente, outras variantes foram disseminadas em microrganismos como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (66–68). Em *Acinetobacter* spp., estas enzimas foram relatadas em alguns países europeus e asiáticos e na América do Sul (64,69–73). A MBL SIM-1 (Seul imipenemase) é codificada pelo gene *bla_{SIM-1}*, que foi encontrado como parte de um integron de classe 1, em isolados de *Acinetobacter* spp. da Coreia do Sul, sendo também descrito na China (74–76). Até então, é a MBL menos frequentemente descrita em *Acinetobacter* spp., não tendo sido detectada no Brasil. Além disso, outra MBL denominada NDM (*New Delhi* metalo- β -lactamase), com duas variantes NDM-1 e NDM-2, tem sido reportada em *Acinetobacter* spp. em

diversos países, como China, Índia, Japão, França, Egito, Canadá, e também no Brasil (77–84).

Dentre as β -lactamases, as pertencentes à classe D de Ambler, conhecidas como enzimas hidrolisantes de carbapenêmicos (CHDLs) ou oxacilinases (OXAs), são consideradas um dos mais importantes determinantes de resistência a carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. (85). Carbapenemases da classe D não são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam ou EDTA, porém sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio. Os genes que codificam para essas enzimas podem estar inseridos em integrons, assim como estar associados a sequências de inserção e transposons, sendo encontrados tanto no cromossomo, quanto em plasmídeos. Atualmente, as oxacilinases podem ser divididas em seis grupos: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-48-like (86). O primeiro grupo identificado em *Acinetobacter* spp. foi o OXA-23-like em estudo realizado na Escócia e, desde então, esta enzima tem sido detectada em várias regiões do mundo, demonstrando um grande potencial de disseminação. No Brasil, o gene *bla*_{OXA-23} é o mais relatado dentre os que codificam β -lactamases (45,87), podendo estar associado a três transposons Tn2006, Tn2007 e Tn2008 (88,89). A OXA-23 tem capacidade de hidrólise maior para imipenem do que para meropenem, e, ao contrário de outras CHDLs pode, sozinha, determinar resistência aos carbapenêmicos (86). O maior grupo de oxacilinases compreende a OXA-51-like, codificada pelo gene *bla*_{OXA-51-like}, que é considerado cromossômico e foi, inicialmente, detectado na Argentina (90). Esse gene era utilizado como alvo para identificar *A. baumannii* (91), já que se acreditava que era intrínseco somente nesta espécie, porém,

esse gene foi detectado em *A. nosocomialis* e *Acinetobacter* genoespécie *close to 13TU*, descaracterizando essa propriedade (92,93). Dentre as enzimas OXA-51-like, as propriedades cinéticas foram estudadas nas variantes OXA-51 e OXA-69, identificando que essas enzimas têm uma capacidade fraca de hidrólise frente aos carbapenêmicos. Porém, a presença da sequência de inserção IS_{Aba1}, *upstream* aos genes *bla*_{OXA-51-like}, leva à superexpressão destes genes, aumentando as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os carbapenêmicos (86,94,95).

Considerando a disseminada resistência aos carbapenêmicos no complexo ACB, as polimixinas A e E têm sido amplamente empregadas no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (40). Estes fármacos agem como detergentes catiônicos, interagindo com o lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) e causando uma instabilidade na membrana externa dos microrganismos. Além disso, pode induzir a produção de radicais hidroxila e causar a morte celular rápida (96). Casos de resistência a esses antimicrobianos já foram descritos, estando associados, em *A. baumannii*, à perda ou modificação de LPS e ao sistema PmrAB. Este sistema atua com dois componentes responsáveis por controlar a expressão do gene *pmrC*, que atua na síntese do LPS, sendo a mutação do gene *pmrB* responsável pela sensibilidade reduzida às polimixinas (97). Entretanto, recentemente, na China, resistência à colistina mediada por plasmídeo contendo o gene *mcr-1*, que codifica para a proteína MCR-1 com atividade de fosfoetanolamina transferase, foi descrita em *E. coli* isolada de amostras de carne, animais e humanos. Esse gene também já foi encontrado em outras enterobactérias oriundas de outros países, como Dinamarca, África, Itália e Alemanha (98–103).

A avaliação da CIM para as polimixinas tem sido alvo de investigações, considerando que os métodos atuais padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) apresentam variabilidade nos resultados quando avaliados em *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e enterobactérias (104–106). Na técnica de microdiluição em caldo, o antimicrobiano, que possui características policatiônicas, se adere ao material da microplaca utilizada (geralmente poliestireno), tornando-se parcialmente indisponível, o que pode levar a valores falsamente elevados. Alguns estudos exploraram essa hipótese realizando esse método com a adição de um surfactante (Tween 80), que atuaria ligando-se ao plástico da microplaca, impedindo a aderência do antimicrobiano, o que proporcionaria, então, uma maior disponibilidade de antimicrobiano no meio para atuar no microrganismo e, conseqüentemente, gerar resultados fidedignos no método de microdiluição. Com isso, os resultados destes estudos demonstram valores de CIMs diminuídos quando utilizado o Tween 80 (107,108). A CIM para as polimixinas também tem sido determinada através da utilização de fitas contendo concentrações crescentes do fármaco, como as fitas de E-test, que, em alguns casos, têm proporcionado valores menores que os encontrados na microdiluição em caldo. A CIM também pode ser avaliada através de diluição em ágar, que quando comparada à microdiluição em caldo, pode resultar em valores mais elevados (106,109).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a suscetibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos do complexo *A. calcoaceticus-baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Determinar a suscetibilidade a fármacos antimicrobianos em isolados clínicos do complexo *A. calcoaceticus-baumannii*, previamente caracterizados como resistentes aos carbapenêmicos, através da técnica de difusão de discos em agar;

1.2.2.2 Determinar a concentração inibitória mínima de meropenem e polimixina B em isolados clínicos do complexo *A. calcoaceticus-baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;

1.2.2.3 Detectar os genes que codificam para as β -lactamases *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23} em isolados clínicos do complexo *A. calcoaceticus-baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;

1.2.2.4 Detectar a presença de integrons das classes 1 e 2 em isolados clínicos do complexo *A. calcoaceticus-baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;

Capítulo 2

Artigo Científico

**Antimicrobial susceptibility and detection of carbapenem
resistance determinants in clinical *Acinetobacter*
calcoaceticus-baumannii complex isolates**

Artigo científico submetido ao periódico científico *International Journal of Antimicrobial Agents*, publicado pela *Elsevier*.

Fator de impacto: 4.097

Guia dos autores: <http://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-antimicrobial-agents/0924-8579/guide-for-authors>

Capítulo 3

Considerações finais

3.1 Considerações finais

A resistência a antimicrobianos constitui um problema global de saúde pública (110) que necessita de atenção contínua por de todos os profissionais envolvidos na assistência à saúde. Microrganismos pertencentes ao complexo ACB, principalmente *A. baumannii*, são responsáveis por infecções de difícil tratamento, geralmente em pacientes internados em UTIs, estando entre os patógenos que frequentemente causam infecções e conseguem escapar dos efeitos dos antimicrobianos em todo o mundo (47,111,112). A dificuldade de tratamento das infecções por esses patógenos está associada, principalmente, à capacidade que os mesmos possuem de adquirir mecanismos de resistência, o que faz com que cada vez mais sejam encontrados fenótipos MDR, XDR e, até mesmo, PDR (25).

Quarenta e seis diferentes perfis de suscetibilidade a antimicrobianos foram encontrados nos isolados avaliados neste trabalho, sendo mais frequentemente encontrado o de não-suscetibilidade a pelo menos um antimicrobiano de todas as categorias testadas, exceto polimixina B. Esses dados geraram uma caracterização de XDR para 82,5% dos isolados, e MDR em 17,5%, demonstrando o quão difícil é o tratamento para as infecções ocasionadas por microrganismos do complexo ACB.

Dentre os determinantes de resistência investigados, *bla*_{OXA-23} foi encontrado em todos os isolados, mostrando a sua disseminação no hospital de origem dos isolados, e também corroborando com o que vem sendo relatado mundialmente (88,113). A grande maioria dos isolados investigados

nesse estudo apresentaram integrons de classe 1 e 2, ou pelo menos uma das classes, o que indica que esses isolados não só são capazes de adquirir determinantes de resistência, como também são facilmente capazes de transmiti-los. A caracterização dos integrons de classe 1 mostrou que aqueles que tiveram a região variável amplificada foram divididos em quatro grupos de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados e investigados quanto ao seu conteúdo. Genes que codificam resistência a aminoglicosídeos e trimetoprim, assim como outro de função não identificada foram encontrados. O conteúdo completo dos fragmentos maiores já amplificados, bem como novas reações de amplificações empregando métodos que possam determinar o conteúdo de regiões variáveis não amplificadas neste trabalho serão avaliados futuramente.

Embora altos percentuais de resistência a antimicrobianos tenham sido detectados, a maioria dos isolados foi suscetível à doxiciclina, minociclina e polimixina B. A polimixina B constitui a principal alternativa para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos, o que reforça a importância da correta determinação da CIM para este antimicrobiano. Neste trabalho, constatou-se que a adição do surfactante polissorbato 80 mostrou diferença na interpretação dos resultados, provavelmente devido à característica policatiônica da polimixina B, que a torna capaz de se ligar ao poliestireno da microplaca utilizada nas microdiluições (106,108,109). Infere-se que o surfactante atua impedindo a ligação do antimicrobiano à microplaca, conseqüentemente o liberando em maior quantidade no meio de cultivo para interação com o inóculo. Na comparação da técnica de E-test com o método de referência adotado neste trabalho

(microdiluição em caldo), foram encontrados dois *major errors* (ME) e um *very major error* (VME), os valores em sua maioria apresentaram-se diminuídos no E-test, consistindo uma discrepância de 58,8%. Mesmo com valores diminuídos, uma alta taxa de *categorical agreement* (CA) foi verificada. Estudos anteriores relatam valores diminuídos quando testados isolados suscetíveis, assim como altas taxas de VME, com valores baixos de *essential agreement* (EA) (106,109). A presença de MEs e VMEs é preocupante em virtude desta técnica ser amplamente utilizada nos laboratórios clínicos, o que conseqüentemente pode levar ao uso inadequado do fármaco e conseqüente falha terapêutica. Na diluição em ágar, sete ME foram encontrados na comparação com o método de referência, com valores de CA e EA de 58,8%. Valores levemente aumentados têm sido, de modo geral, encontrados em CIMs avaliadas através de diluição em ágar (109,114). Essa variabilidade entre os resultados demanda uma nova padronização das técnicas para a avaliação de CIM para as polimixinas, visto que cada vez mais *Acinetobacter* spp. XDR são encontrados, exigindo o uso de polimixinas como tratamento para infecções causadas por eles.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a capacidade que microrganismos do complexo ACB possuem de adquirir mecanismos de resistência, evidenciando as altas taxas de não-suscetibilidade aos principais antimicrobianos utilizados terapeuticamente. Os dados gerados podem embasar novas estratégias terapêuticas e também evidenciar a importância das medidas preventivas frente a microrganismos que carregam determinantes de resistência em ambiente hospitalar. Considerando que os isolados coletados neste trabalho pertencem a um mesmo hospital, sendo a sua maioria de UTI,

faz-se importante a investigação da relação genética dos mesmos, o que constitui uma perspectiva deste trabalho, que será realizada através de técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(3):538–82.
2. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. n.d. <http://www.bacterio.net/Acinetobacter.html> (Acesso em: abril de 2016)
3. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(2):277–82.
4. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. *Research in Microbiology*. 2011; 162(4):393-404
5. Fitzpatrick MA, Ozer E, Bolon MK, Hauser AR. Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *Journal of Infection*. 2015;70(2):144–52.
6. Khosravi AD, Sadeghi P, Shahraki AH, Heidarieh P, Sheikhi N. Molecular methods for identification of *Acinetobacter* species by partial sequencing of the rpoB and 16S rRNA genes. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015;9(7):DC09–13.
7. Lee MJ, Jang SJ, Li XM, Park G, Kook JK, Kim MJ, Chang YH, Shin JH, Kim SH, Kim DM, Kang SH, Moon DS. Comparison of rpoB gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;78(1):29–34.
8. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12):4592–4.
9. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(11):1097–103.
10. Toh BEW, Paterson DL, Kamolvit W, Zowawi H, Kvaskoff D, Sidjabat H, Wailan A, Peleg AY, Huber CA. Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*. 2015;118:128–32.
11. Sousa C, Botelho J, Silva L, Grosso F, Nemec A, Lopes J, Peixe L. MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex species. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;304(5-6):669–77.

12. Pailhoriès H, Daure S, Eveillard M, Joly-Guillou ML, Kempf M. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex: A relevant alternative to molecular biology? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;83(2):99–104.
13. Henig O, Weber G, Hoshen MB, Paul M, German L, Neuberger A, Gluzman I, Berlin A, Shapira C, Balicer RD. Risk factors for and impact of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: matched case–control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(10):2063–8.
14. Gayoso CM, Mateos J, Méndez J a, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Ilarduya OM, Bou G. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*. 2014;13(2):460–76.
15. Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B, Xi C. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *American Journal of Infection Control*. 2016;44(5): e65–e71.
16. Fournier P, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(1):692–9.
17. World Health Organization. Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. 2010. Disponível em: http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_20101102/en/ (Acesso em: abril de 2016).
18. ANVISA. Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidade de terapia intensiva (2014). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 12. 2015.
19. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CAP, Carneiro I, Reis M, Souza MA, Tranches R, Barata CU, and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(5):1866–71.
20. Camargo LFA, Marra AR, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PPP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CAP, Carneiro I, Reis M, Souza MA, Barata CU, Edmond MB, and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in a nationwide study: Comparison between solid organ transplant patients and the general population. *Transplant Infectious Disease*. 2015;17(2):308–13.
21. Freire MP, Pierrotti LC, Cristina I, Soares V, Bonazzi PR, Oliveira LM De, Machado AS, Van Der Heijden IM, Rossi F, Costa SF, D'Albuquerque LAC, Abdala E. Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii*

- Acquired before Liver Transplantation: Impact on Recipient Outcomes. *Liver Transplantation*. 2016;22(5):615-26.
22. Trecarichi EM, Pagano L, Candoni A, Pastore D, Cattaneo C, Fanci R, Nosari A, Caira M, Spadea A, Busca A, Vianelli N, Tumbarello M. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: An Italian multicentre prospective survey. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(4):337–43.
 23. Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP, Campagnari Bueno MF, Camargo CH, Kono Magri ASG, Francisco GR, Reghini R, Vieira MF, Ibrahim KY, Rossi F, Hajjar L, Levin AS, Hoff PM, Pierrotti LC, Abdala E. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(4):352–8.
 24. Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *Journal of Hospital Infection*. 2012;80(4):351–3.
 25. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010;2(3):291–304.
 26. Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, Nibbering PH, Earl AM, Ward DV, Paterson DL, Seifert H, Dijkshoorn L. The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One*. 2012;7(10):e46984.
 27. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):608–20.
 28. Taherikalani M, Maleki A, Sadeghifard N, Mohammadzadeh D, Soroush S, Asadollahi P, Asadollahi K, Emaneini M. Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals, Iran. *Polish Journal of Microbiology*. 2011;60(2):169–74.
 29. Zhao W-H, Hu Z-Q. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*. 2015;10(5):873-87.
 30. Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, Roy PH. Int12 Integron Integrase in Tn7. *Journal of Bacteriology*. 2002;184(6):1712–21.
 31. Peters JE, Craig NL. Tn7: smarter than we thought. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(11):806–14.
 32. Ramírez MS, Morales A, Vilacoba E, Márquez C, Centrón D. Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) clones of *Acinetobacter baumannii*. *Current Microbiology*. 2012;64(3):290–3.
 33. Pagano M, Martins a F, Machado a BMP, Barin J, Barth a L.

- Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAba1 upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2013;141(2):330–3.
34. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55(12):1619–29.
 35. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(1):268–81.
 36. Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Minandri F, Ištók M, Bošnjak Z, Frančula-Zaninović S, et al. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014;33(3):471–8.
 37. Bocanegra-Ibarias P, Peña-López C, Camacho-Ortiz A, Llaca-Díaz J, Silva-Sánchez J, Barrios H, Garza-Ramos U, Rodríguez-Flores AM, Garza-González E. Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(3):309–13.
 38. Chmielarczyk A, Pilarczyk-Żurek M, Kamińska W, Pobiega M, Romaniszyn D, Ziółkowski G, et al. Molecular Epidemiology and Drug Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Hospitals in Southern Poland: ICU as a Risk Factor for XDR Strains. *Microbial Drug Resistance*. 2016;22(4): 328-35.
 39. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(11):868–73.
 40. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2014;15(10):1351-70.
 41. Ni W, Shao X, Di X, Cui J, Wang R, Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(1):8–18.
 42. Liang W, Liu X-F, Huang J, Zhu D-M, Li J, Zhang J. Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases*. 2011;11(1):109.
 43. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy*. 2011;55(11):4943–60.
44. Kempf M, Rolain J. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012;39(1):105–14.
 45. Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(9):1138–43.
 46. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;73(4):354–60.
 47. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *American Journal of Infection Control*. 2012;40(2):108–12.
 48. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Bou G, Tomás M. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(11):5247–57.
 49. Ambler RP. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 1980;289(1036):321–31.
 50. Poirel L, Bonnin R a, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(5):883–93.
 51. Bonnin R a, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, et al. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(9):E362–5.
 52. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a french hospital. 2003;41(8):3542–7.
 53. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;58(1):178–82.
 54. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):1354–7.
 55. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1277:91–104.
 56. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;27 Suppl 1(Suppl 1):S48–53.

57. Spencer J, Clarke a R, Walsh TR. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic beta-lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-beta-lactamase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(36):33638–44.
58. Thompson JS, Malamy MH. Sequencing the Gene for an Imipenem-Cefoxitin-Hydrolyzing Enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus*, B-Lactamase II. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(5):2584–93.
59. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35(1):147–51.
60. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the Metallo-beta-Lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54 / 97 Reveals the existence of bla IMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(5):1229–35.
61. Gales AC, Tognim MCB, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003;45(1):77–9.
62. Chu Y-W, Afzal-Shah M, Houang ETS, Palepou M-FI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM. IMP-4, a novel Metallo-Beta-Lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(3):710–4.
63. Silva GJ, Correia Mãj, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, 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 Microbiology Letters*. 2002;215(1):33–9.
64. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y. Metallo-Beta-Lactamase-producing gram-negative bacilli :laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5256–63.
65. Kouyama Y, Harada S, Ishii Y, Saga T, Yoshizumi A, Tateda K, Yamaguchi K. Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing non-baumannii *Acinetobacter* species. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012;18(4):522–8.
66. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa*

- clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(7):1584–90.
67. Papagiannitsis CC, Pollini S, De Luca F, Rossolini GM, Docquier J-D, Hrabák J. Biochemical characterization of VIM-39, a VIM-1-Like Metallo- β -Lactamase variant from a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(12):7811–4.
 68. Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(7):1792–5.
 69. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(6):981–3.
 70. Jones RN, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;78(4):429–36.
 71. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM, Davies TA, Jones RN. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel beta-lactamases, GES-22 e VIM-35. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(12):7358–66.
 72. Lee K, Ha GY, Shin B-M, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, Yong D, Chong Y; Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance (KONSAR) group. Metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004;50(1):51–8.
 73. Martins HSI, Bomfim MRQ, França RO, Farias LM, Carvalho MAR, Serufo JC, et al. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014;11(2):1465–78
 74. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J-D, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(11):4485–91.
 75. Zhou Z, Du X, Wang L, Yang Q, Fu Y, Yu Y. Clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baylyi* strain coharboring *bla*SIM-1 and *bla*OXA-23 from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(11):5347–9.

76. Kim Y, Roh KH, Lee Y, Chung H-S, Yum JH, Yong D, Lee K, Chong Y. Clonal change of *bla*SIM-1-carrying *Acinetobacter* spp. from 2003 to 2008 in the hospital where it was initially discovered. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(1):37–41.
77. Bonnin R a, Poirel L, Nordmann P. New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiology*. 2014;9(1):33–41.
78. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(12):1699–701.
79. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus T a, Gatermann SG, Bonnin R a, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;66(6):1260–2.
80. Yong D, Toleman M a, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 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 pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(12):5046–54.
81. Nakazawa Y, li R, Tamura T, Hoshina T, Tamura K, Kawano S, Tetsuro Kato, Fumiya Sato, Tetsuya Horino, Masaki Yoshida, Seiji Hori. A case of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* transferred from India to Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19(2):330–2.
82. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Jun;66(6):1255–9.
83. Pillionetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(12):7592–4.
84. Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(4):444–5.
85. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;57(1):1–3.
86. Evans B a, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(2):241–63.
87. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;79(4):468–72.
88. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*.

Emerging Infectious Diseases. 2010;16(1):35–40.

89. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *blaOXA-23* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(4):1530–3.
90. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(1):15–23.
91. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *blaOXA-51*-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974–6.
92. Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pitt CP, Barth AL. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAbal-blaOXA-23 genes in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(8):2739–41.
93. Lee Y-T, Kuo S-C, Chiang M-C, Yang S-P, Chen C-P, Chen T-L, Fung CP. Emergence of carbapenem-resistant non-baumannii species of *Acinetobacter* harboring a *blaOXA-51*-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(2):1124–7.
94. Figueiredo S, Poirel L, Croize J, Recule C, Nordmann P. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAbal-mediated overexpression of the natural *blaOXA-66* oxacillinase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(6):2657–9.
95. Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Hsueh PR, Chang FY, Siu LK, Ko WC, Fung CP. Emergence and distribution of plasmids bearing the *blaOXA-51*-like gene with an upstream ISAbal in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11):4575–81.
96. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(11):5642–9.
97. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15.
98. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015;16(2):161-8.

99. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas RS, Cavaco LM, Hansen DS, Aarestrup FM, Skov RL. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro surveillance*. 2015;20(49).
100. Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(3):285-6.
101. Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(5):3257–8.
102. Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L, Chakraborty T. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(3):282-3.
103. Zeng K, Doi Y, Patil S, Huang X, Tian G-B. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(6):3862-3.
104. Girardello R, Bispo PJM, Yamanaka TM, Gales AC. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7):2414–8.
105. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy*. 2015;35(1):22–7.
106. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1678–84.
107. Sutherland CA, Nicolau DP. To add or not to add Polysorbate 80: Impact on colistin MICs for clinical strains of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* and quality controls. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(10):3810.
108. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74(4):412–4.
109. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(8):4625–30.

110. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
111. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(1):1–12.
112. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(10):3471–84.
113. Raro O. Identificação e determinação de resistência antimicrobiana em isolados nosocomiais de *Acinetobacter baumannii*. PUCRS. 2012. (Dissertação de Mestrado).
114. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(1):183–90.