

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**“IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES, PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE E PREVALÊNCIA DE OXACILINASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* sp. PROCEDENTES DE QUATRO
ESTADOS BRASILEIROS”**

Lisiane da Luz Rocha

PORTO ALEGRE

2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**“IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES, PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE E PREVALÊNCIA DE OXACILINASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* sp. PROCEDENTES DE QUATRO
ESTADOS BRASILEIROS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas como requisito para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Afonso Luís Barth

Lisiane da Luz Rocha

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha, Lisiane
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES, PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE E PREVALÊNCIA DE OXACILINASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* sp. PROCEDENTES DE QUATRO
ESTADOS BRASILEIROS / Lisiane Rocha. -- 2013.
56 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complexo
(ACB). 2. carbapenêmicos. 3. oxacilinases. I. Barth,
Afonso Luís, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha irmã Rafaela

e aos meus pais Rosane e Luiz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Afonso Luís Barth pela oportunidade de aprendizado, pelos ensinamentos, pela sua dedicação e amizade. Professor e pesquisador que sempre terá minha admiração.

Ao Dr. Jorge Sampaio por toda a dedicação e carinho para a realização desse trabalho. Por todos os ensinamentos prestados, e em especial a prática na biologia molecular.

À Dra. Andreza Martins toda a minha gratidão e carinho pelo auxílio em todas as etapas desse trabalho.

Ao Grupo Fleury pela disponibilização do banco de microorganismos e fornecimento de insumos para a realização dos testes.

À doutoranda Mariana Pagano a colaboração, auxílio e amizade.

Às minhas colegas, às coordenadoras e ao gestor do Laboratório Weinmann meu agradecimento especial pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Resistência Bacteriana – LABRESIS pela amizade e apoio.

Aos meus familiares e amigos meu eterno agradecimento pelo incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos em que eu estava ausente.

Ao Fabrizio Balzan por todo amor, carinho e compreensão.

A todos que contribuíram com este trabalho.

RESUMO

Introdução: O complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) inclui as espécies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*. As infecções causadas pelas diferentes espécies do ACB, principalmente *A. baumannii* tornam-se cada vez mais graves com a emergência de cepas resistentes a quase todos os antimicrobianos incluindo os carbapenêmicos, principalmente devido à produção de oxacilinases. O objetivo desse estudo foi identificar as diferentes espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) e determinar a prevalência de oxacilinases em isolados resistentes aos carbapenêmicos obtidos de quatro estados brasileiros.

Materiais e métodos: No período de abril a outubro de 2013, avaliamos 92 isolados identificados previamente como ACB complexo, resistente aos carbapenêmicos de quatro estados brasileiros: Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Os isolados foram submetidos a identificação utilizando o equipamento MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany) e após, comparados com o sequenciamento do gene *gyrB*. Uma amostra de conveniência de 11 isolados não-*A. baumannii* também foram submetidas à identificação no sistema MALDI-TOF e ao sequenciamento. A avaliação da suscetibilidade foi determinada pelo método de disco difusão para os antimicrobianos: amicacina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftazidima, gentamicina, piperacilina-tazobactam e para polimixina por microdiluição em caldo. Foi realizado ensaio de PCR multiplex para avaliação de genes de resistência: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143.

Resultados: Oitenta e nove (97%) isolados clínicos foram identificados como *A. baumannii* pelo sistema MALDI-TOF e confirmados pelo sequenciamento do gene *gyrB*. O sistema MALDI-TOF identificou corretamente 8/11 (72,7%) das espécies não-*A. baumannii*. Em relação a polimixina B, a maioria dos isolados (96,7%) foram sensíveis (CIM \leq 2 $\mu\text{g/mL}$) sendo que apenas 3 (3,3%) isolados apresentaram CIM \geq 4 $\mu\text{g/mL}$ para esse antimicrobiano. Quanto a presença das oxacilinases, 80 (87%) dos isolados apresentaram OXA-23-like e esses foram

procedentes dos 4 estados avaliados. No entanto, foram identificados 12 (13%) isolados produtores de OXA-24-like sendo todos procedentes do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. **Conclusão:** Neste estudo foi possível constatar que o sistema MALDI-TOF identifica corretamente a espécie de *A. baumannii* mas apresentou limitações para identificação das espécies de *A. nosocomialis* e *A. pittii*. Observamos elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos e a disseminação de OXA-23 em todos os estados avaliados. Além disso, Identificamos pela primeira vez a presença da enzima OXA-24-like em isolados de *A. baumannii* no sul do Brasil.

Palavras chaves: complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB), carbapenêmicos, oxacilinases

ABSTRACT

Introduction: The *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex (ACB) includes species: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*. Infections caused by different species of the ACB, especially *A. baumannii* became increasingly severe, with the emergence of strains resistant to almost all antibiotics including carbapenems, primarily due to the production of oxacilinases. The aim of this study was to identify the different species of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex (ACB) and to determine the prevalence of oxacilinases in isolates resistant to carbapenems obtained from four Brazilian states. **Material and Method:** Between April to October 2013, we analyzed 92 strains previously identified as ACB complex, resistant to carbapenems from four Brazilian states: Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo. The isolates were subjected to identification using MALDI-TOF MS System (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany) and to sequencing of the *gyrB* gene. A convenience sample comprising 11 isolates of non-*A. baumannii* were also submitted to identification in MALDI-TOF system, and sequencing. The evaluation of the susceptibility was determined by disk diffusion method for the following antimicrobials: amikacin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ceftazidime, gentamycin, piperacillin-tazobactam; for polymyxin we used the broth microdilution method. A multiplex PCR assay was performed to evaluate the resistance genes: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like and OXA-143. **Results:** Eighty-nine (97%) clinical isolates were identified as *A. baumannii* by MALDI-TOF system, and confirmed by sequencing of the *gyrB* gene. The MALDI-TOF system correctly identified only 8/11 (72.7%) of non-*A. baumannii* isolates. In relation to polymyxin B, the majority of isolates (96.7%) were susceptible (MIC \leq 2 μ g/mL) and only 3 (3.3%) of the isolates showed MIC \geq 4 μ g/mL for this antimicrobial. Regarding the presence of oxacilinases, 80 (87%) isolates presented OXA-23-like and these were obtained from the 4 states evaluated. Furthermore, 12 (13%) isolates

producing OXA-24-like were identified, all from Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo. **Conclusion:** In the present study, we were able to determine that the MALDI TOF System correctly identifies the species of *A. baumannii* and has limitations for identification of *A. nosocomialis* and *A. pittii*. We notice high rates of antimicrobial resistance and the spread of OXA-23 in all states evaluated. Moreover, for the first time we identified the presence of the enzyme OXA-24-like in isolates of *A. baumannii* in southern Brazil.

Key words: *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex (ACB), carbapenems, oxacilinases

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Distribuição das OXA-carbapenemases em <i>Acinetobacter</i> sp na América do Sul	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB - complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*

ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

CRAb - *A. baumannii* resistentes ao imipenem e ao meropenem

GES - Guiana-extend spectrum

gyrB - gene codificador da subunidade B da DNA girase

IMP - Imipenemase

ITS - Intergenic Spacer

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MALDI-TOF MS - Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

MBL - metalo-beta-lactamases

MDR - resistência a múltiplos antimicrobianos

NDM - New Dheli metalo-beta-lactamases

PCR - Polymerase Chain Reaction

rRNA - ribonucleic acid ribossomal

UTI - Unidades de Terapia Intensiva

VIM - Verona Imipenemase

XDR - extensively drug resistant

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO.....	14
2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>A. baumannii-calcoaceticus</i>	14
2.3 INFECÇÕES POR COMPLEXO <i>A. baumannii-calcoaceticus</i>	17
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM <i>Acinetobacter</i> spp	18
2.4.1 OXACILINASES.....	20
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.REFERÊNCIAS.....	24
ARTIGO 1	32
ARTIGO 2	50

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* compreende cocobacilos Gram negativos não-fermentadores de glicose, imóveis, aeróbicos e oxidase negativa [1]. No laboratório de microbiologia apresenta crescimento em meios usuais de rotina como ágar sangue de carneiro e ágar MacConkey. Está amplamente distribuído no ambiente hospitalar, sendo identificado como um dos principais responsáveis por colonizações e/ou infecções em pacientes internados [2].

Acinetobacter baumannii é conhecida como a espécie mais importante do gênero e faz parte do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. O complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) inclui as espécies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*. Os métodos convencionais utilizados na rotina do laboratório clínico não permitem distinguir essas espécies, dificultando a sua identificação correta. Contudo, a identificação precisa em nível de espécie é importante para uma melhor compreensão do papel de cada uma delas nas infecções e surtos hospitalares [3, 4].

Diferentes metodologias moleculares têm sido propostas para a diferenciação das espécies do ACB. Metodologias baseadas na análise de restrição da região intergênica 16S-23S do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) bem como a análise das sequências de nucleotídeos dos genes *recA*, *rpoB* e *gyrB* tem sido utilizadas para identificação de espécies de *Acinetobacter* [1, 5, 6]. Mais recentemente, a técnica de espectrometria de massa utilizando o sistema MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) também tem sido utilizada como uma alternativa para identificar mais rapidamente e com menor custo as espécies do ACB [7].

As infecções causadas pelas diferentes espécies do ACB, principalmente *A. baumannii*, tornam-se cada vez mais graves com a emergência de cepas resistentes a quase todos os antimicrobianos incluindo os

carbapenêmicos. Esses isolados clínicos caracterizados como cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos, denominadas de MDR, têm como última opção terapêutica somente as polimixinas ou tigeciclina [8, 9].

Cepas de *A. baumannii* resistentes ao imipenem e ao meropenem (CRAb), foram descritas em varias regiões do mundo e estão associadas com elevadas taxas de morbidade e mortalidade [10]. Os principais fatores associados a essas infecções são imunossupressão, uso de terapia antimicrobiana prévia e procedimentos invasivos [11].

Muitos mecanismos estão envolvidos nessa resistência, como a expressão de bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade da membrana, mas a produção de carbapenemases é o mecanismo mais importante epidemiologicamente [12, 13]. Embora diferentes tipos de carbapenemases possam ser encontradas em *Acinetobacter* sp., como por exemplo, as enzimas da classe B (metalo-beta-lactamases - MBL) de Ambler, as mais prevalentes são as enzimas da classe D, OXA-carbapenemases, sendo OXA-23 a mais comumente encontrada [14]. No entanto, a distribuição das espécies do ACB bem como a prevalência dos genes de resistência pode variar em diferentes países ou em diferentes regiões de um mesmo país.

Assim, o objetivo desse estudo foi identificar as diferentes espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) e determinar a prevalência de oxacilinas nos isolados resistentes aos carbapenêmicos em quatro estados brasileiros: Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO

O gênero *Acinetobacter* pertence à família Moraxellaceae e ordem Gammaproteobacteria. O gênero *Acinetobacter* utiliza como energia fontes de carbono que podem ser encontrados em diversos locais como água, solo, superfícies inanimadas e no hospedeiro humano [2].

Atualmente mais de 30 espécies de *Acinetobacter* já foram descritas sendo que entre elas se destacam: *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johsonii*, *A. lwoffii* e *A. radioresistens*. A classificação do gênero é complexa e tem sido modificada ao decorrer dos anos [1, 2]. No entanto, *Acinetobacter baumannii* é a espécie mais comumente identificada em amostras clínicas. Em relação às diferentes espécies do ACB, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* são as espécies associadas à infecções nosocomiais enquanto que *A. calcoaceticus* é uma espécie ambiental [3, 4, 13].

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *A. baumannii-calcoaceticus*

Como mencionado, o complexo ACB é composto de quatro espécies que são indistinguíveis pelos métodos fenotípicos utilizados na rotina laboratorial. Deste modo, é difícil avaliar a real importância clínica e epidemiológica destas espécies, pois a identificação usual limita-se a caracterizar o complexo ACB e não cada espécie isoladamente [3, 4].

Os testes fenotípicos podem ser manuais (série bioquímica), semi-automatizados ou automatizados.. Os sistemas automatizados como Vitek® II (BioMérieux, França), MicroScan WalkAway® (SiemensR, Deerfield, USA) e BD Phoenix® (Becton Dickinson, USA) também não conseguem discriminar as

espécies do complexo ACB e seus resultados acabam sendo similares aos testes manuais [15].

Os testes genotípicos incluem métodos moleculares, como o sequenciamento de diferentes genes ou regiões do DNA bacteriano. A região *Intergenic Spacer* (ITS) entre os genes codificadores do rRNA 16s e 23s é a mais utilizada para identificação das espécies. O fragmento correspondente ao ITS no complexo ACB é relativamente pequeno, o que torna fácil o sequenciamento das espécies. Estas regiões possuem baixos graus de variação intraespécies e altos graus de variação interespecies [16], sendo por isso considerado o padrão-ouro para a identificação.

Outro método que pode ser utilizado é o sequenciamento do gene codificador da subunidade B da DNA girase (*gyrB*), que é um método eficaz para identificação de espécies de *Acinetobacter* [17]. A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex utilizando como alvo a região do *gyrB*, é um teste útil na identificação das espécies do complexo ACB, apresentando altas taxas de concordância com o sequenciamento [18].

O gene *rpoB* codifica a subunidade beta da enzima RNA polimerase, é uma ferramenta simples e útil para a identificação e classificação de várias espécies bacterianas, incluindo as espécies de *Acinetobacter* [5]. O gene *recA*, codifica uma proteína indispensável para a manutenção e diversificação do material genético bacteriano. No entanto, é recomendado apenas como um método de triagem inicial, sendo necessário outro método para confirmação das espécies [18, 19].

Recentemente a metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF MS, tem sido implementada na rotina do laboratório de microbiologia clínica para identificação de diferentes espécies de bactérias. A metodologia consiste na identificação bacteriana a partir de uma colônia isolada em meios de cultura usuais ou a utilização do próprio material clínico, como amostras de sangue conforme protocolos disponíveis pelo fabricante. O método trata-se de uma

ferramenta rápida para identificação de espécies bacterianas e tem apresentado resultados promissores [7, 20].

O procedimento para a realização do teste de identificação no MALDI-TOF é de simples execução e o resultados final é obtido de forma bastante rápida. A colônia bacteriana isolada é colocada em uma placa com matriz polimérica, que é inserida no equipamento. O material bacteriano é irradiado com feixes de laser curtos e os íons formados são acelerados e aspirados em um tubo de vácuo, sendo levados até um detector. De acordo com a massa e a carga elétrica da molécula obtém-se um tempo de "vôo" espécie-específico que o sistema converte em um gráfico e compara com os resultados de um banco de dados [21, 22].

Alguns estudos tem utilizado o MALDI-TOF na identificação de espécies de *Acinetobacter*. No estudo de Antonella e colaboradores, foram selecionadas 35 cepas de *A. baumannii* – MDR, provenientes de pacientes em um hospital da Itália. Essas cepas foram analisadas através do MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany) e após, comparadas com metodologia molecular. De acordo com os autores, os resultados sugerem que o equipamento pode ser utilizado na rotina do laboratório de microbiologia [23].

Em 2012, Espinal e colaboradores utilizaram o MALDI-TOF para identificar as espécies do complexo ACB e outras espécies de *Acinetobacter*, comparando com Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), ITS, sequenciamento do gene *recA* e presença de *bla*_{OXA-51}. Os resultados apresentaram 100% de concordância do MALDI-TOF com a análise do gene *recA*. Quando compararam os três métodos, obtiveram uma correlação de 98,3% (59/60) das cepas analisadas [24].

As principais vantagens de utilização do MALDI-TOF são que as espécies bacterianas são identificadas rapidamente na rotina do laboratório de microbiologia. Trata-se de uma metodologia de alto custo no investimento inicial do equipamento, mas possui baixo custo de insumos sendo de fácil

utilização pelo analista. A correta identificação das espécies do complexo ACB é importante para avaliação epidemiológica. As espécies podem apresentar diferenças no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, características de mecanismo de patogenicidade e tropismo diverso pelos sítios de infecções [25].

2.3 INFECÇÕES POR COMPLEXO *A. baumannii-calcoaceticus*

As infecções por bacilos Gram-negativo são as principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) [26]. Entre as bactérias Gram negativas, os bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. são os mais comuns causadores de infecções hospitalares [14].

Os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* estão envolvidos em infecções nosocomiais como septicemia, infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório muitas vezes associado ao uso de ventilação mecânica e a uma variedade de outras infecções [27].

A. baumannii tem sido identificado em culturas de vigilância no ambiente hospitalar e em diferentes regiões do corpo do paciente além das culturas convencionais de diversos materiais clínicos [28, 29]. Os fatores de riscos para colonização ou infecção por *Acinetobacter baumannii* incluem fatores como: severidade da doença, tempo de internação prolongado, internação em UTI, ventilação mecânica, procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana prévia [26, 30, 31].

Apesar de *A. baumannii* ser considerada a espécie do complexo ACB mais importante clinicamente, alguns estudos relatam a importância das outras espécies do complexo ACB em amostras clínicas. Park e colaboradores avaliaram amostras de bacteremia no período de 2003-2010. Foram identificadas 180 cepas do complexo ACB, com os seguintes resultados: 50%

A. baumannii, 33% *A. nosocomialis*, 9% *Acinetobacter* não-*baumannii*, 6% *A. pittii* e 1% *A. calcoaceticus* [32].

Outro estudo também avaliou a prevalência de espécies do complexo ACB em 215 amostras de hemocultura que foram identificadas como: 54,4% *A. baumannii*, 35,8% *A. nosocomialis* e 9,8% *A. pittii* [33]. Já na Noruega, um estudo avaliou 113 isolados de hemoculturas no período de 2005-2007 e foi relatada a prevalência de: 46,9% *A. nosocomialis*, 19,5% *A. pittii*, 8,8% *A. baumannii* e 7,1% de outras espécies não incluídas no complexo ACB [34].

A prevalência das espécies do complexo ACB, bem como seu perfil de resistência pode variar de acordo com a região geográfica das amostras em estudo. A suscetibilidade diminuída aos carbapenêmicos nos isolados de *A. baumannii* é frequentemente observada. Em relação às demais espécies do complexo, a susceptibilidade aos carbapenêmicos é muito variável. Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou dois isolados de *A. nosocomialis* resistentes aos carbapenêmicos na cidade de Porto Alegre [35] demonstrando a importância clínica e epidemiológica da caracterização das diferentes espécies do complexo ACB.

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM *Acinetobacter* spp.

Na última década tem se observado um aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos no gênero *Acinetobacter*. Os isolados de *A. baumannii* se caracterizam pela capacidade de acumular diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, tornando o tratamento das infecções difícil e com poucas opções terapêuticas [36].

Os carbapenêmicos como imipenem e o meropenem, são os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções nosocomiais graves causadas por *Acinetobacter baumannii*. No entanto, isolados CRAB muitas vezes são suscetíveis apenas às polimixinas [37, 38]. Contudo, já foi descrita

na literatura resistência à polimixina, piorando ainda mais o prognóstico dos pacientes [39].

Diversos mecanismos estão envolvidos na resistência aos antimicrobianos, tais como a expressão de bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade da membrana [12, 40]. No entanto, o mecanismo mais comum de resistência é a produção de enzimas capazes de degradar o anel beta-lactâmico. A degradação enzimática dos beta-lactâmicos, em *Acinetobacter* sp., ocorre principalmente devido à produção de carbapenemases. A classificação das β -lactamases está baseada nas sequências de aminoácidos (classificação molecular) – classificação de Ambler ou de acordo com outras características, como capacidade em degradar diferentes β -lactâmicos, de ser inibidas por inibidores de β -lactamases - classificação de Bush e Jacoby [41].

A classificação de Ambler (tabela 1) baseia-se na estrutura das sequências dos aminoácidos e foi dividida em quatro classes principais. A classe A composta pelas enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e GES (Guiana-extend spectrum), a classe B que refere-se às metalo-beta-lactamases tipo VIM (Verona Imipenemase), IMP (Imipenemase) e NDM (New Dheli metalo-beta-lactamases). A classe C é formada pelas cefalosporinases cromossômicas do tipo AmpC e a classe D formada pelas Oxacilinas. Essa última classe é a mais prevalente em *A. baumannii* e de acordo com a classificação de Bush-Jacoby faz parte do grupo funcional 2df [41].

As OXA-carbapenemases possuem mais de 150 variantes descritas e são divididas em nove grupos com base na sequência de aminoácidos e similaridade genética, sendo que OXA-23 é a mais prevalente em *A. baumannii* [42]. Estudos realizados em diversas regiões geográficas já demonstraram a elevada prevalência de OXA-23 em isolados clínicos de *A. baumannii* [43-45].

2.4.1 OXACILINASES

Os isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapanêmicos, expressando oxacilinases têm sido descritos em todo o mundo. As oxacilinases possuem capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos quando associadas a elementos de inserção como *ISAba1*, que atuam como sequências promotoras destes genes [46].

As oxa-carbapenemases já identificadas em ACB são divididas em 6 subfamílias: OXA-51 considerada uma enzima constitutiva da espécie *A. baumannii*, OXA-23, OXA-24-like, OXA-58, OXA-143 e a OXA-235. No Brasil já foram relatadas cepas produtoras de todas essas enzimas, com exceção de OXA-235 [47, 48].

As enzimas OXA-23, OXA-24-like e OXA-58 já foram relatadas mundialmente e foram identificadas pela primeira vez na Escócia, Espanha e França respectivamente [48-51]. A identificação da OXA-143 foi descrita e relatada somente no Brasil e recentemente, a enzima OXA-235 foi isolada nos Estados Unidos e no México [48, 52]. A Tabela 2 mostra a distribuição das Oxas-carbapenemases na América do Sul.

OXA-23 é a principal enzima associada a resistência aos carbapenêmicos em cepas de *A. baumannii* [53]. No Brasil, o primeiro relato de OXA-carbapenemase em *A. baumannii* foi descrito em Curitiba em 2003, em que foi relatada a presença da enzima OXA-23. Logo após foram relatados surtos relacionados à presença do gene *bla*_{OXA-23} no Rio de Janeiro e Porto Alegre [54, 55]. O gene *bla*_{OXA-23} já foi descrito também em *A. pittii* e *A. nosocomialis* [56-58].

A enzima OXA-24 possui um subgrupo com cinco variantes: OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72 e OXA-160 [42, 59]. Em Recife, foram descritas duas cepas de *A. baumannii extensively drug resistant* (XDR) com produção da

enzima OXA-72, isoladas em dois hospitais diferentes. Anteriormente, a OXA-72 já havia sido isolada em São Paulo [60]. Assim como OXA-23, a OXA-72 já foi detectada em espécies não-*baumannii*. Em 2012, foi descrito na Colômbia o primeiro caso de *A. pittii* produtor de OXA-72 [61].

Higgins e colaboradores (2009) relataram a identificação da enzima OXA-143 em isolados das regiões Sudeste e Sul do Brasil do ano de 2004. Essa enzima possui 88% de similaridade com a OXA-40 e foi descrita nas amostras dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná [62]. A enzima OXA-58 foi relatada na cidade de São Paulo e após, descrita na cidade do Rio de Janeiro [52, 63].

Tabela 1. Distribuição das OXA-carbapenemases em *Acinetobacter* sp na América do Sul

OTC subgrupo	Países	Localização dos genes	Referências bibliográficas (número)
OXA-51	Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Venezuela	Cromossomo	18
OXA-23	Argentina, Colômbia, Brasil	Cromossomo Plasmídeo	18
OXA-40	Brasil, Chile	Plasmídeo	47
OXA-58	Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Venezuela	Plasmídeo	18
OXA-143	Brasil	Plasmídeo	62

Adapatado de Opazo, 2010.

OTC: oxa-tipo-carbapenemase

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as diferentes espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) e determinar a prevalência de oxacilinases nos isolados resistentes aos carbapenêmicos em quatro estados brasileiros: Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) em isolados resistentes ao imipenem e ao meropenem;
- Verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos para amicacina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftazidima, gentamicina, piperacilina-tazobactam por disco difusão e polimixina por microdiluição em caldo;
- Determinar a prevalência das enzimas OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like e OXA-143.

4. REFERÊNCIAS

1. Bergogne-Berezin, E. and K.J. Towner, *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 1996. 9(2): p. 148-65.
2. Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21(3): p. 538-82.
3. Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert, An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. 5(12): p. 939-51.
4. Gerner-Smidt, P., I. Tjernberg, and J. Ursing, Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*, 1991. 29(2): p. 277-82.
5. La Scola, B., et al., Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(3): p. 827-32.
6. Gundi, V.A., et al., Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*, 2009. 155(Pt 7): p. 2333-41.
7. Jacquier, H., et al., Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011. 30(12): p. 1579-86.
8. Lee, J.H., et al., Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 59(4): p. 633-9.

9. Gordon, N.C. and D.W. Wareham, Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. 35(3): p. 219-26.
10. Kuo, L.C., et al., Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clin Microbiol Infect*, 2007. 13(2): p. 196-8.
11. Landman, D., et al., Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 60(1): p. 78-82.
12. Pournaras, S., et al., Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 57(3): p. 557-61.
13. Poirel, L. and P. Nordmann, Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 2006. 12(9): p. 826-36.
14. Zavascki, A.P., et al., Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010. 8(1): p. 71-93.
15. Nemec, A., et al., *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. 59(Pt 1): p. 118-24.
16. Chang, H.C., et al., 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*, 2005. 43(4): p. 1632-9.

17. Alvarez-Buylla, A., E. Culebras, and J.J. Picazo, Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol*, 2012. 12(2): p. 345-9.
18. Higgins, P.G., et al., gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol*, 2010. 48(12): p. 4592-4.
19. Krawczyk, B., K. Lewandowski, and J. Kur, Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the recA sequences. *Mol Cell Probes*, 2002. 16(1): p. 1-11.
20. Anderson, D.S., et al., Design and validation of a high-throughput matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry method for quantification of hepcidin in human plasma. *Anal Chem*, 2011. 83(21): p. 8357-62.
21. Benagli, C., et al., Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*, 2011. 6(1): p. e16424.
22. Murray, P.R., What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*, 2012. 14(5): p. 419-23.
23. Mencacci, A., et al., Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2013. 51(2): p. 603-6.
24. Espinal, P., et al., Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*, 2012. 18(11): p. 1097-103.

25. Chuang, Y.C., et al., Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. *Clin Infect Dis*, 2011. 52(3): p. 352-60.
26. Cisneros, J.M. and J. Rodriguez-Bano, Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect*, 2002. 8(11): p. 687-93.
27. Maragakis, L.L. and T.M. Perl, *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*, 2008. 46(8): p. 1254-63.
28. Gales, A.C., et al., Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*, 2001. 32 Suppl 2: p. S104-13.
29. Ayan, M., et al., Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect*, 2003. 54(1): p. 39-45.
30. Corbella, X., et al., Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(11): p. 4086-95.
31. Koeleman, J.G., et al., Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2001. 22(5): p. 284-8.
32. Park, K.H., et al., The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e65026.

33. Lee, Y.C., et al., *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *J Antimicrob Chemother*, 2011. 66(8): p. 1839-46.
34. Karah, N., et al., Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother*, 2011. 66(4): p. 738-44.
35. Teixeira, A.B., et al., First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAba1-blaOXA-23 genes in Latin America. *J Clin Microbiol*, 2013. 51(8): p. 2739-41.
36. Cai, Y., et al., Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67(7): p. 1607-15.
37. Zavascki, A.P., et al., Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 60(6): p. 1206-15.
38. Gales, A.C., R.N. Jones, and H.S. Sader, Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*, 2011. 66(9): p. 2070-4.
39. Falagas, M.E., et al., Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. 35(2): p. 194-9.
40. Munoz-Price, L.S. and R.A. Weinstein, *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*, 2008. 358(12): p. 1271-81.

41. Jacoby, T.S., et al., Impact of hospital-wide infection rate, invasive procedures use and antimicrobial consumption on *bacterial* resistance inside an intensive care unit. *J Hosp Infect*, 2010. 75(1): p. 23-7.
42. Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann, Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(1): p. 24-38.
43. Werneck, J.S., et al., Low prevalence of blaOXA-143 in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(9): p. 4494-5; author reply 4495.
44. Mostachio, A.K., et al., High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*, 2012. 39(5): p. 396-401.
45. Pagano, M., et al., Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect*, 2012: p. 1-4.
46. Turton, J.F., et al., The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. 258(1): p. 72-7.
47. Opazo, A., et al., OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries*, 2012. 6(4): p. 311-6.
48. Higgins, P.G., et al., OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(5): p. 2121-6.
49. Higgins, P.G., et al., Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004

- using rep-PCR and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(11): p. 3493-500.
50. Poirel, L., et al., OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(1): p. 202-8.
 51. Bou, G., A. Oliver, and J. Martinez-Beltran, OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(6): p. 1556-61.
 52. Antonio, C.S., et al., High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(3): p. 1322-3.
 53. Martins, N., et al., Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: Reflection of a global expansion. *Infect Genet Evol*, 2013. 20: p. 378-80.
 54. Dalla-Costa, L.M., et al., Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(7): p. 3403-6.
 55. Martins, A.F., et al., Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*, 2009. 37(5): p. 474-6.
 56. Mugnier, P.D., et al., Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*, 2010. 16(1): p. 35-40.

57. Brivio, M., et al., Integrated microfluidic system enabling (bio)chemical reactions with on-line MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*, 2002. 74(16): p. 3972-6.
58. Boo, T.W., F. Walsh, and B. Crowley, Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *J Med Microbiol*, 2009. 58(Pt 2): p. 209-16.
59. Tian, G.B., et al., Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(1): p. 429-32.
60. de Sa Cavalcanti, F.L., et al., Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. 77(3): p. 250-1.
61. Montealegre, M.C., et al., First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. 56(7): p. 3996-8.
62. Higgins, P.G., et al., OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(12): p. 5035-8.
63. Figueiredo, S., et al., Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin Microbiol Infect*, 2012. 18(9): p. 907-13.

ARTIGO 1

Artigo para submissão ao Brazilian Journal of Microbiology.

"CARBAPENEM RESISTANT *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex:
IDENTIFICATION OF SPECIES, SUSCEPTIBILITY PROFILE AND
PREVALENCE OF OXACILINASES IN FOUR BRAZILIAN STATES"

Lisiane Rocha^{1,2,6}, Andreza F. Martins³, Mariana Pagano⁴, Juliana Coutinho
Campos⁵, Jorge Luiz M. Sampaio⁶, Afonso Luis Barth^{1,2,4}

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

² Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

⁵Universidade de São Paulo, Brazil

⁶Grupo Fleury, Brazil

Correspondence Author:

Afonso Luís Barth

albarth@hcpa.ufrgs.br

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350

Ramiro Barcelos St, Porto Alegre 90.035-903, Brazil

1 ABSTRACT

2 The *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex includes the
3 species *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*. Correct
4 identification of ACB complex and determination of the mechanism of
5 carbapenem resistance is especially important for epidemiological purposes.
6 The objective of this study was to identify the species of the ACB complex,
7 evaluate the susceptibility profile and determine the prevalence of oxacilinases
8 in carbapenem resistant isolates recovered from four Brazilian states. We
9 analyzed 92 isolates from São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná and Rio Grande
10 do Sul. The isolates were subjected to MALDI-TOF MS and sequencing of the
11 gene *gyrB*. Evaluation of susceptibility was performed by disk diffusion and
12 broth microdilution. The identification of oxacilinases was performed by
13 multiplex PCR to OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-
14 143. Eighty-nine (97%) isolates were identified as *A. baumannii* by MALDI-TOF
15 equipment and by sequencing. The MALDI-TOF identified correctly 8/11
16 (72.7%) of the species non-*A. baumannii*. We observed high rates of resistance
17 to antimicrobials except polymyxin B. Eighty (87%) isolates from all states
18 presented OXA-23-like and twelve (13%) isolates presented OXA-24-like
19 recovered from the states Paraná, Rio Grande do Sul and São Paulo. In this
20 study it was observed that the MALDI-TOF correctly identifies the species of *A.*
21 *baumannii* and has limitations for identification of other species of the ACB
22 complex. We observed high rates of antimicrobial resistance, and also report

23 the dissemination of OXA-23 in the evaluated states, and identified for the first
24 time OXA-24-like enzyme, isolated in southern Brazil.

25 **Key words:** *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex,
26 carbapenem resistance, oxacilinases

27

28 The *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex includes the
29 species: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* (1,2). Clinical
30 isolates resistant to imipenem and meropenem, have been reported in many
31 regions of the world and they are associated with high morbidity and mortality
32 (3). Conventional methods used in routine laboratory are unable to distinguish
33 between species of the ACB. Furthe, several molecular methods have been
34 proposed for differentiation among these species (2,3,5). Recently, the mass
35 spectrometry MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time
36 of flight mass spectrometry) has been implemented in clinical microbiology
37 laboratory for identification of bacterial species (7,8). Infections caused by
38 species of the ACB complex become increasingly important due to the
39 production of carbapenemases and often the isolates are susceptible only to
40 polymyxins (9,10). The most prevalent carbapenemase in *A. baumannii* are
41 OXA-carbapenemases, and the less frequently metallo-beta-lactamases. The
42 OXA-carbapenemases already identified in ACB complex are divided into 6
43 subfamilies: OXA-51-like considered a constitutive enzyme from *A. baumannii*,
44 OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143 e a OXA-235. In Brazil,

45 strains producing enzymes of all these families have already been reported,
46 except for OXA-235 (10,11). The aim of this study was to identify the different
47 species of the ACB complex, to evaluate the susceptibility profile and to
48 determine the prevalence of oxacilinases in isolates resistant to carbapenems
49 from four Brazilian states: Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul
50 (RS) and São Paulo (SP).

51 **MATERIALS AND METHODS**

52 Bacterial isolates

53 Between July 2013 and October 2013 we collected isolates of ACB complex,
54 previously identified by the Vitek® II system (BioMérieux, France) from clinical
55 specimens and surveillance specimens (one isolate per patient). These isolates
56 were recovered from four states, two in the south (Curitiba - PR, Porto Alegre -
57 RS) and two in the southeast (Rio de Janeiro - RJ, São Paulo - SP) of the
58 country.

59 Identification of species of the ACB complex

60 Isolates of the ACB complex were identified by MALDI-TOF MS system (Bruker
61 Daltonik, Bremen, Germany) version 2.0 and the sequencing of the *gyrB* gene.

62 MALDI-TOF MS

63 A bacterial colony was placed on a plate with polymeric matrix and inserted into
64 the machine. The identification of the genus and species was considered correct
65 according to the following: a score of ≥ 2.000 indicated species level

66 identification, a score of 1.700 to 1.999 indicated identification to the genus
67 level, and a score of <1.700 was interpreted as “no identification”. To evaluate
68 the capacity of this methodology to identify non-*A. baumannii* isolates, we used
69 11 isolates of the following species: 6 isolates of *A. pittii* and 5 *A. nosocomialis*.

70

71 Sequencing of the *gyrB* gene

72 To sequencing of the *gyrB* gene, we used the primers reported by Yamamoto *et*
73 *al.* (12). PCR amplification of *gyrB* was performed with a Applied Biosystems®
74 Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler by using PCR reaction buffer 5X Phusion
75 HF containing each of the deoxynucleoside triphosphates 1,0 µl, each of the
76 primers at a concentration of 10 pmol/uL each 1,0 µl , DNA 2,6 µl and 0,5 µl
77 Phusion DNA polymerase (Perkin-Elmer) in a total volume of 50µl. A total of 35
78 cycles of amplification was performed with template DNA denaturation at 98 °C
79 for 10s, annealing at 57 °C for 30s and extension at 72 °C for 10 min. Amplified
80 products were electrophoresed on 1,5% low-melting-temperature agarose gels
81 (Seaplaque GTG, FMC Bioproducts) and purified by using QIAquick® (Qiagen).
82 The sequences produced were compared with different sequences of ACB
83 complex available in the GenBank and subsequently, aligned using the BioEdit
84 software version 7.1.3.

85 Susceptibility Profile

86 The antimicrobial susceptibility profile was performed by disk diffusion (Oxoid®)
87 for amikacin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ceftazidime, piperacillin-

88 tazobactam and gentamicin. Polymyxin B was evaluated by broth microdilution.
89 Results were interpreted according CLSI M100-S23 - *Clinical and Laboratory*
90 *Standards Institute*. The chi-square Test or Fisher's Exact Test was used to
91 statistical analyses with significance at 5% ($p \leq 0.05$).

92 Presence of oxacilinases genes

93 Presence of the *bla*_{oxa-51-like}, *bla*_{oxa-23-like}, *bla*_{oxa-24-like}, *bla*_{oxa-58-like} and *bla*_{oxa-143} was
94 performed by a multiplex PCR using specific primers as described previously
95 (13).

96 RESULTS

97 A total of 92 isolates of ABC were recovered, 31 (34%) isolates from Porto
98 Alegre, 28 (30%) from Rio de Janeiro, 21 (23%) from Curitiba and 12 (13%)
99 from São Paulo.

100 Identification of species of the ACB complex

101 The MALDI-TOF MS system correctly identified 8 (72.7%) of the species non-
102 *A. baumannii*. Two isolates of *A. nosocomialis* were identified as *A. baumannii*
103 (score > 2.3) and one isolate of *A. pittii*, identified to the genus level as *A.*
104 *guiollouiae* (score 1.7). Among the 89 isolates, eighty-nine (96.7%) were
105 identified as *A. baumannii* by the MALDI-TOF MS system and confirmed by
106 sequencing of the *gyrB* gene. Two (3,3%) isolates were discordant: identified as
107 *A. nosocomialis* in the MALDI-TOF MS and as *A. baumannii* by sequencing.

108 One isolate (0,9%) had inconclusive results in the MALDI-TOF MS and was
109 identified as *A. baumannii* by sequencing (Table 1).

110 Susceptibility Profile

111 The majority of isolates (56; 61%) showed resistance to the 6 antimicrobial
112 agents tested. However, some differences with statistically significant were
113 identified among the states: in São Paulo the number of isolates resistant to
114 gentamicin were lower than in the other states (16.7%; $p = 0.001$); in Rio
115 Grande do Sul the number of isolates resistant to amikacin were higher than in
116 the others (51.6%; $p = 0.005$) and the same occurred to ceftazidime in Rio de
117 Janeiro (75%; $p = 0.023$) (table 2). Regarding polymyxin B, most of the isolates
118 (89; 96.7%) were susceptible ($MIC \leq 2 \mu\text{g/mL}$) and only three isolates presented
119 $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ (figure 1).

120 Presence of oxacilinases genes

121 The OXA-51-like was identified in all isolates; 80 (87%) of the isolates
122 presented OXA-23-like and these were recovered from the four states. It was
123 also possible to identify 12 (13%) isolates producing OXA-24-like from Rio
124 Grande do Sul, Paraná and São Paulo. The OXA-58-like and OXA-143
125 enzymes were not detected.

126 **DISCUSSION**

127 The prevalence of species and the resistance profile of the ACB complex may
128 vary according to the geographic region. However, *A. baumannii* is the most

129 frequently isolated species in nosocomial infections and is associated with high
130 resistance to carbapenems (14). In this study, we selected only isolates
131 previously identified as ACB complex by the Vitek system which presented
132 resistance to imipenem and meropenem and these were all confirmed as *A.*
133 *baumannii* by the methods used (MALDI-TOF and *gyrB* sequencing). Therefore,
134 no other species of the ACB complex were identified in the four Brazilian states
135 evaluated. In the present study, the MALDI-TOF proved to be a quick and easy
136 method for identification of *A. baumannii* isolates obtaining agreement score of
137 100% compared to the molecular method. In a similar study, Mencacci *et al.*
138 (15) selected 35 isolates of *A. baumannii* - MDR which were analyzed by
139 MALDI-TOF MS and compared with molecular methodology. The results
140 presented 100% concordance for *A. baumannii*, the same result observed in our
141 study.

142 In the evaluation of non-*A. Baumannii* strains we obtained only 72.7%
143 concordance. It is noteworthy that the score obtained using the MALDI-TOF for
144 the two specimens identified as *A. nosocomialis* was considered adequate for
145 identification at the species level. In 2013, Sedo *et al.* (16) used a new protocol
146 to identify the ACB complex, using MALDI TOF. The authors evaluated *A.*
147 *baumannii* (n = 32) *A. nosocomialis* (n = 29) *A.pittii* (n = 22) and *A calcoaceticus*
148 (n = 22) strains. The results of the study presented, better identification of
149 strains of ACB complex when compared with the standard protocol, with 90%
150 accuracy for the proposed new protocol and 86% accuracy for the standard
151 protocol. In this study we used, the standard protocol for bacterial identification

152 and we found similar results to previous studies in the identification of isolates
153 of *A. baumannii* and non-*A. baumannii*.

154 Higher rates of antimicrobial resistance were observed in the four states, but
155 some differences in antibiotic susceptibility (gentamicin, amikacin and
156 ceftazidime) were noted according to different regions. Isolates of *A. baumannii*
157 multidrug-resistant (MDR), have only a few therapeutic options remaining:
158 susceptible to polymyxins and tigecycline (17,18).

159 In our study, two isolates of *A. baumannii* presented polymyxin MIC of 8 mg/mL
160 and one isolate showed MIC of 4 mg/mL which are considered resistant to
161 polymyxin. Therefore, isolates in this study presented a low percentage of
162 resistance to polymyxin, only 3 (3%) of the total number analyzed in four
163 Brazilian states. Phenotypes related to polymyxin resistance are worrisome as
164 they may impair antimicrobial therapy (19).

165 The main enzyme associated with carbapenem resistance in isolates of *A.*
166 *baumannii* is OXA-23 (20). In this study, all four Brazilian states confirmed the
167 high prevalence of *A. baumannii* OXA-23 producing resistant to carbapenems.
168 However, 12 (13%) were identified as isolates producing OXA-24-like from 3
169 states: Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo. The OXA-24 enzyme has a
170 subgroup of five variants: OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72 and OXA-160
171 (21,22). In Recife, two strains of *A. baumannii* have already been described as
172 extensively drug resistant (XDR) with production of the enzyme OXA-72.
173 Previously, OXA-72 had been isolated in Sao Paulo (23).

174 In this study, the equipment MALDI TOF MS correctly identified the species *A.*
175 *baumannii*, but has limitations to identify species of *A. nosocomialis* and *A. pittii*.
176 We observed high rates of antimicrobial resistance and dissemination of OXA-
177 23 in all States evaluated. In addition, we have identified for the first time, the
178 presence of the enzyme OXA-24-like in isolates of *A. baumannii* in southern
179 Brazil.

Table 1. Identification different species of the ACB complex

	Number of isolates	MALDI-TOF MS	<i>gyrB</i>	OXA-51
RS	31	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
RJ	25	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
	1*	<i>A. baumannii/A. nosocomialis</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
	2	<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
PR	21	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
SP	12	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Positive
Total	92			

* inconclusive result by MALDI-TOF MS

Table 2. Profile of antimicrobial resistance of *A. baumannii*

	Rio Grande do Sul n = 31	Rio de Janeiro n = 28	São Paulo n = 12	Paraná n =21
Amikacin¹	51,6% (16)	60,7% (17)	91,7% (11)	90,5% (19)
Ampicillin-sulbactam	100% (31)	84,3% (25)	91,7% (11)	100% (21)
Cefepime	96,8% (30)	85,7% (24)	100% (12)	90,5% (19)
Ceftazidime²	83,9% (26)	75% (21)	100% (12)	100% (21)
Gentamicin³	64,5% (20)	50,0% (14)	16,7% (2)	85,7% (18)
Piperacilin-tazobactam	100% (31)	100% (28)	100% (12)	100% (21)

¹p = 0.005

²p = 0.023

³p = 0.001

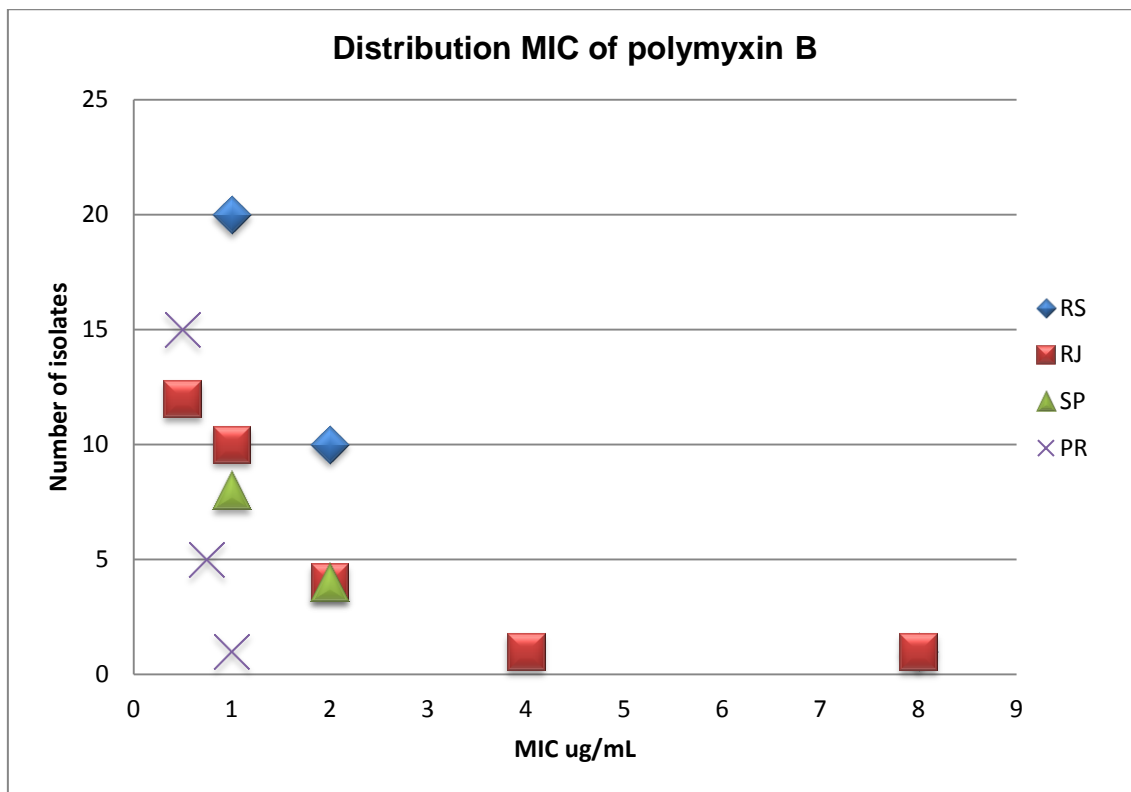


Figure 1. Distribution MIC of polymyxin B isolates of *A. baumannii*

REFERENCES

1. Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev, 2008. 21(3): p. 538-82.
2. Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert, An increasing threat in hospitals: *multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol, 2007. 5(12): p. 939-51.
3. Kuo, L.C., et al., Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(2): p. 196-8.
4. La Scola, B., et al., Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol, 2006. 44(3): p. 827-32.
5. Jacquier, H., et al., Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. 30(12): p. 1579-86.
6. Alvarez-Buylla, A., E. Culebras, and J.J. Picazo, Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? Infect Genet Evol, 2012. 12(2): p. 345-9.

7. Zavascki, A.P., et al., Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 60(6): p. 1206-15.
8. Gales, A.C., R.N. Jones, and H.S. Sader, Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*, 2011. 66(9): p. 2070-4.
9. Zarrilli, R., et al., Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*, 2009. 3(5): p. 335-41.
10. Opazo, A., et al., OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries*, 2012. 6(4): p. 311-6.
11. Higgins, P.G., et al., OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(5): p. 2121-6.
12. Yamamoto, S., P.J. Bouvet, and S. Harayama, Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol*, 1999. 49 (1): p. 87-95.
13. Woodford, N., et al., Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*, 2006. 27(4): p. 351-3.

14. Park, K.H., et al., The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter bacteremia* according to genospecies. PLoS One, 2013. 8(6).
15. Mencacci, A., et al., Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol, 2013. 51(2): p. 603-6.
16. Sedo, O., et al., Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. Syst Appl Microbiol, 2013. 36(8): p. 572-8.
17. Lee, J.H., et al., Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. J Antimicrob Chemother, 2007. 59(4): p. 633-9.
18. Gordon, N.C. and D.W. Wareham, Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents, 2010. 35(3): p. 219-26.
19. Falagas, M.E., et al., Inhaled colistin for the treatment of tracheobronchitis and pneumonia in critically ill children without cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol, 2010. 45(11): p. 1135-40.
20. Zavascki, A.P., et al., Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010. 8(1): p. 71-93.

21. Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann, Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(1): p. 24-38.
22. Tian, G.B., et al., Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(1): p. 429-32.
23. de Sa Cavalcanti, F.L., et al., Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. 77(3): p. 250-1.

1 **ARTIGO 2**

2 Artigo para submissão no Journal of Clinical Microbiology

3

4 **First report of carbapenem-resistant *A. baumannii* carrying the *bla*_{OXA-24-like}**
5 **in southern Brazil**

6 Lisiane Rocha^{1,2,5}, Andreza F. Martins^{1,3}, Mariana Pagano^{1,4}, Jorge Luiz M.
7 Sampaio⁵, Afonso Luis Barth^{1,2,4*}

8

9 ¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS, Hospital de
10 Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

11 ² Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina,
12 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

13 ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre,
14 Brazil

15 ⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de
16 Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre,
17 Brazil

18 ⁵Grupo Fleury, Brazil

19

20

21 ***Correspondence Author:**

22 Afonso Luís Barth

23 albarth@hcpa.ufrgs.br

24 Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350

25

26 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre 90.035-903, Brazil

27

28 **Abstract**

29 The objective of this study was to report the presence of *bla*_{oxa-51-like}, *bla*_{oxa-23-like},
30 *bla*_{oxa-24-like}, *bla*_{oxa-58-like} and *bla*_{oxa-143} in 92 isolates. 87% of isolates were positive
31 to *bla*_{oxa-23-like} and 13% were positive to *bla*_{oxa-24-like}. This is the first report of *A.*
32 *baumannii* isolates presenting *bla*_{oxa-24-like} in southern Brazil.

33

34

35 **Running title: Detection the the *bla*_{OXA-24-like} in southern Brazil**

36

37

38 **Key words:** *A. baumannii* resistant, OXA-23-like, OXA-24-like

39

40

41 Strains of *A. baumannii* resistant to imipenem and meropenem (CrAb) have
42 been related in various regions of the world and are associated with high
43 morbidity and mortality (1). The isolates of CRAb are characterized by the ability
44 of express several mechanisms to antimicrobial resistance, difficult to treat
45 infections because the therapeutic options are limited (2). Though different
46 types of carbapenemases may be found in *Acinetobacter* species, the most
47 prevalent are the enzymes of the class D OXA-carbapenemases (3).

48 The OXA-carbapenemases have more than 150 described variants and are
49 divided into nine groups based on amino acid sequence and genetic similarity
50 (4), of these, six subfamilies have been described in *Acinetobacter*
51 *calcoaceticus-baumannii* complex (ACB): OXA-51-like considered a constitutive
52 enzyme from *A. baumannii*, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143
53 and OXA-235. In Brazil have been reported strains of all these enzymes, with
54 the exception of OXA-235 (5,6).

55 In this study we evaluated 92 isolates of *A. baumannii* resistant to imipenem
56 and meropenem from four Brazilian states of Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ),
57 Rio Grande do Sul (RS) and São Paulo (SP). The isolates were identified by
58 Vitek® II system (BioMérieux, France) and confirmed by sequencing of *gyrB*
59 gene.

60 The presence of the *bla*_{oxa-51-like}, *bla*_{oxa-23-like}, *bla*_{oxa-24-like}, *bla*_{oxa-58-like} and *bla*_{oxa-143}
61 was performed by PCR using primers and a multiplex assay described
62 previously (7). In all isolates the *bla*_{oxa-51-like} was detected, 80 (87%) isolates
63 presented *bla*_{oxa-23-like} and these were from of the four states. Furthermore, 12
64 (13%) isolates were identified as *bla*_{oxa-24-like} producers and these isolates
65 originated from RS, PR and SP. Isolates positive to *bla*_{oxa-24-like} were submitted
66 to sequencing to confirm PCR results.

67 OXA-23 is the main enzyme associated with carbapenem resistance in *A.*
68 *baumannii* (8). In Brazil, the first report of OXA-23 in *A. baumannii* was reported
69 in Curitiba in 2003. In the following years, outbreaks related to the presence of
70 the *bla*_{OXA-23-like} were reported in Rio de Janeiro and Porto Alegre (8,9). The
71 *bla*_{OXA-23-like} gene has also been described in *A. pittii*. and *A. nosocomialis*
72 (10,11).

73 The OXA-24 enzyme has a subgroup of five variants: OXA-24/40, OXA-25,
74 OXA-26, OXA-72 and OXA-160 (12,13). In Recife, two strains of *A. baumannii*
75 were described as extensively drug resistant (XDR) with production of the
76 enzyme OXA-72, isolated in two different hospitals. Previously, OXA-72 had
77 been isolated in Sao Paulo. OXA-72 has been detected in non- *A. baumannii*
78 species, as well as OXA-23. In 2012, Colombia was described in the first case
79 of *A. pittii* producing OXA-72 (13,14).

80 *A. baumannii* isolates producing OXA-24-like have been reported in different
81 countries, including regions of the northeast and southeast of Brazil. However,
82 this is the first report of *A. baumannii* with *bla*_{oxa-24-like} in Rio Grande do Sul and
83 Paraná. This indicates that this oxacillinase is spreading in our country since it

84 has been identified in several states. Moreover, our results suggest that the
85 spread of the OXA-24 enzyme in southern Brazil is not related to the high
86 prevalence of the OXA-23 enzyme, because we did not detect both enzymes in
87 the same isolate.

88

89 **Reference List**

90

91 1. **Kuo LC, Lai CC, Liao CH, Hsu CK, Chang YL, Chang CY, et al.**
92 Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features,
93 antimicrobial therapy and outcome. *Clinical microbiology and infection : the*
94 *official publication of the European Society of Clinical Microbiology and*
95 *Infectious Diseases*. 2007;13(2):196-8.

96

97 2. **Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A,**
98 **Samuelsen O, et al.** Species identification and molecular characterization of
99 *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *The Journal of*
100 *Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(4):738-44.

101

102 3. **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter*
103 *baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical microbiology and infection :*
104 *the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and*
105 *Infectious Diseases*. 2006;12(9):826-36.

106

107 4. **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of
108 class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
109 2010;54(1):24-38.

110

- 111 5. **Opazo A, Dominguez M, Bello H, Amyes SG, Gonzalez-Rocha G.**
112 OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America.
113 Journal of Infection in developing countries. 2012;6(4):311-6.
114
- 115 6. **Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G,**
116 **Seifert H.** OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to
117 carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and
118 Chemotherapy. 2013;57(5):2121-6.
119
- 120 7. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown**
121 **S, et al.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in
122 *Acinetobacter* spp. International Journal of Antimicrobial Agents.
123 2006;27(4):351-3.
124
- 125 8. **Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC.** Multidrug-resistant
126 *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance
127 mechanisms and implications for therapy. Expert review of anti-infective
128 therapy. 2010;8(1):71-93.
129
- 130 9. **Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L,**
131 **et al.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23
132 enzyme: dissemination in Southern Brazil. Infection. 2009;37(5):474-6.
133
- 134 10. **Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Worldwide dissemination
135 of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerging
136 Infectious Diseases. 2010;16(1):35-40.
137
- 138 11. **Boo TW, Walsh F, Crowley B.** Molecular characterization of
139 carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital:
140 predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. Journal of Medical
141 Microbiology. 2009;58(Pt 2):209-16.

142

143 12. **Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Pasculle AW, Quinn**
144 **JP, Wang HN, et al.** Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases,
145 including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in
146 Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(1):429-32.

147

148 13. **de Sa Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Morais Junior MA,**
149 **de Morais MM, Leal-Balbino TC.** Emergence of extensively drug-resistant
150 OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal
151 dissemination? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
152 2013;77(3):250-1.

153

154 14. **Montealegre MC, Maya JJ, Correa A, Espinal P, Mojica MF, Ruiz SJ,**
155 **et al.** First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in
156 Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(7):3996-8.