

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

GABRIEL DE PAULA GOLLINO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter baumannii* PROVENIENTES DA FRONTEIRA OESTE DO RIO
GRANDE DO SUL**

**Uruguaiiana
2019**

GABRIEL DE PAULA GOLLINO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter baumannii* PROVENIENTES DA FRONTEIRA OESTE DO RIO
GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Vanessa Bley Ribeiro

**Uruguaiana
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

G617c Gollino, Gabriel de Paula

Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes da fronteira oeste do Rio Grande do Sul / Gabriel de Paula Gollino.

65 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2019.

"Orientação: Vanessa Bley Ribeiro".

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Carbapenêmicos. 3. Carbapenemases. 4. OXA-23. 5. Tipagem molecular. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Microbiana (LAPREMIC) da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, e contou com a colaboração do laboratório Biosul Análises Clínicas (Uruguaiana/RS) e o Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto/SP). O projeto recebeu financiamento do Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos (INPRA) - INCT/CNPq: 465718/2014-0. O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedida pelo INPRA, além de auxílio financeiro da CAPES (processo nº 23038.014292/2018-73) para aperfeiçoamento realizado no LEBEM.

GABRIEL DE PAULA GOLLINO

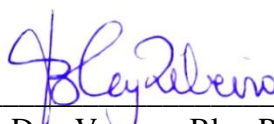
**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Acinetobacter baumannii* PROVENIENTES DA FRONTEIRA OESTE DO RIO
GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 5 de setembro de 2019.

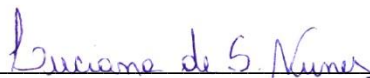
Banca examinadora:



Prof. Dra. Vanessa Bley Ribeiro
Orientadora
UNIPAMPA



Prof. Dra. Priscila de Arruda Trindade
UFSM



Prof. Dra. Luciana de Souza Nunes
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Vanessa Bley Ribeiro, por toda dedicação e carinho sempre. Por todo incentivo e motivação, tanto profissional quanto pessoal. Pela amizade, cumplicidade e principalmente pela confiança. Agradeço também por toda compreensão e paciência. Obrigado por todas as oportunidades únicas.

À Dra. Priscila de Arruda Trindade e Dra. Luciana de Souza Nunes pelo singular apreço e amparo no desenvolvimento experimental das técnicas aplicadas neste trabalho.

À técnica Cláudia Azevedo Pessano pelo companheirismo e harmonia na dinâmica de trabalho do LAPREMIC.

Aos alunos de iniciação científica por toda dedicação e trabalho na execução deste estudo.

À equipe do Biosul pela parceria de longa data, em especial aos farmacêuticos bioquímicos Dr. Ilson da Silveira Dias e Rosa Helena Robales Siqueira.

À equipe do LEBEM, pela oportunidade e apoio na execução da técnica de PFGE para os isolados deste estudo, em especial à Dra. Ana Lucia da Costa Darini, Dra. Joseane Cristina Ferreira e ao Dr. Leonardo Neves de Andrade.

À equipe do LABRESIS pela parceria durante todos estes anos, apoio técnico na identificação bacteriana e fornecimento dos controles necessários para a execução deste trabalho.

Ao INPRA e a CAPES pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos, em especial à Bruna, Bruno e Rafael por estarem ao meu lado sempre e comemorarem comigo cada etapa finalizada.

E por fim, agradeço à minha família por todo suporte e amor durante todos estes anos.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é uma das principais espécies bacterianas relacionadas a infecções hospitalares, frequentemente associada às pneumonias por ventilação mecânica em UTIs. A resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* emergiu mundialmente nas últimas décadas atingindo níveis alarmantes, inclusive para os carbapenêmicos. No Brasil, as taxas de resistência a esta classe em *A. baumannii* é de aproximadamente 80%. O principal mecanismo associado à resistência aos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases da Classe D de Ambler ou OXA-carbapenemases. Ao todo, seis famílias de OXA já foram relatadas em *A. baumannii* sendo a OXA-23 a mais prevalente em isolados do mundo todo. O objetivo deste estudo foi caracterizar isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (AbRC) provenientes da região da fronteira oeste do estado do Rio Grande do Sul quanto ao seu perfil de sensibilidade, prevalência de OXA-carbapenemases e determinar sua relação genética através de tipagem molecular. Os isolados foram provenientes de uma única instituição de saúde e coletados no período de cinco anos. A espécie *A. baumannii* foi identificada através da presença do gene *bla*_{OXA-51} e o perfil de sensibilidade foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo. A detecção fenotípica da produção de carbapenemases foi realizada pelo teste de associação dos inibidores EDTA e ácido fenilborônico aos carbapenêmicos e pelo teste de Blue-Carba. A confirmação molecular foi realizada através da amplificação dos principais genes codificadores de carbapenemases por PCR. A relação genética entre os isolados de AbRC foi determinada pelas técnicas de REP-PCR e PFGE. No período do estudo, um total de 36 ARC foram isolados, provenientes principalmente de amostras clínicas do trato respiratório (66,6%). Além da resistência a todos os β-lactâmicos testados e ao ciprofloxacino, os isolados também apresentaram altos níveis de resistência à gentamicina (86,1%) e amicacina (61,1%). Por outro lado, todos foram sensíveis a polimixina B (CIMs ≤ 1 µg/mL). O gene *bla*_{OXA-23} foi detectado em 34 dos isolados de AbRC. A tipagem revelou a presença de três principais grupos geneticamente relacionados e de quatro linhagens clonais, duas presentes e prevalentes na instituição durante os quatro anos do estudo e duas com origem mais recente, em 2017. A partir dos resultados obtidos foi possível constatar uma elevada prevalência de isolados de AbRC produtores de OXA-23, com a disseminação e permanência de linhagens clonais na instituição. A resistência em *A. baumannii* não é um problema de saúde pública apenas em grandes centros de saúde do país, servindo de alerta sobre a necessidade de medidas mais efetivas de controle e prevenção. Ainda, os resultados deste estudo fornecem os primeiros

dados epidemiológicos desta espécie nesta região do país, contribuindo para a construção de um panorama mais amplo sobre a resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii*.

Palavras-Chave: *A. baumannii*, carbapenêmicos, multirresistência, carbapenemases, OXA-23, tipagem molecular

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is one of the main bacterial species related to nosocomial infections, frequently associated with ventilator-associated pneumonia in ICUs. Antimicrobial resistance in *A. baumannii* has emerged worldwide in recent decades reaching alarming levels, including for carbapenems, with resistance rates achieving approximately 80% in Brazil. The main mechanism associated to carbapenem resistance is the production of Class D carbapenemases or OXA-carbapenemases. Six families of OXA enzymes have been reported in *A. baumannii* and OXA-23 is the most prevalent in isolates worldwide. The aim of this study was to characterize carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAb) clinical isolates from the western border region of Rio Grande do Sul state according to sensitivity profile, prevalence of OXA-carbapenemases and genetic relationship through molecular typing. The isolates were provided from a single health institution and they were collected from 2014 to 2018. The species *A. baumannii* was identified by the presence of the *bla*_{OXA-51} gene and the sensitivity profile was determined by broth microdilution. Phenotypic detection of carbapenemase production was performed by the association test of inhibitors EDTA and phenylboronic acid to carbapenems and by the Blue-Carba test. Molecular confirmation was performed by PCR amplification of the main carbapenemase encoding genes. The genetic relationship among CRAb isolates was determined by REP-PCR and PFGE. During the study period, a total of 36 carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. were isolated, mainly from respiratory tract (66.6%). In addition to resistance to all β -lactams tested and ciprofloxacin, the isolates also showed high level resistance to gentamicin (86.1%) and amikacin (61.1%). On the other hand, all of them were sensitive to polymyxin B (MICs ≤ 1 μ g/mL). The *bla*_{OXA-23} gene was detected in 34 CRAb isolates. Typing revealed the presence of three main genetically related groups and four clonal strains, two present and prevalent in the institution during the four years of the study and two of more recent origin, in 2017. From the results obtained it was possible to verify a high prevalence of OXA-23 producing AbRC isolates, with the dissemination and permanence of clonal strains in the institution. The resistance in *A. baumannii* is not a public health problem only in large health centers in the country, serving as a warning about the need for more effective measures for control and prevention. Furthermore, the results of this study provide the first epidemiological data of this species in this region of the country, contributing to the construction of a broader overview of antimicrobial resistance in *A. baumannii*.

Keywords: *A. baumannii*, carbapenems, multiresistance, carbapenemases, OXA-23, molecular typing

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subgrupos de OXA-carbapenemases descritas em <i>A. baumannii</i>	22
---	----

LISTA DE SIGLAS

- ABC – *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*
- AbRC – *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos
- AFB – Ácido fenilborônico
- AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*
- ARC – *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- ESBL – β -lactamases de espectro estendido
- KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- MBL – Metalo- β -lactamase
- MDR – *Multidrug resistant*
- MLST – *Multilocus sequence typing*
- NDM – New Delhi metalo- β -lactamase
- OXA – Oxacilinase
- PAVM – Pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PFGE – *Pulsed field gel eletrophoresis*
- REP – *Repetitive extragenic palindromic sequence*
- RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*
- UTI – Unidade de terapia intensiva
- XDR – *Extensively drug resistant*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Características do gênero <i>Acinetobacter</i>	17
3.1.2 Espécie <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
3.2 Epidemiologia	18
3.3 Resistência aos antimicrobianos	19
3.4 Mecanismos de resistência aos β-lactâmicos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	20
3.4.1 Oxacilinas	21
3.4.2 Metalo-β-lactamases (MBL)	24
3.5 Detecção fenotípica de carbapenemases	25
3.6 Tipagem molecular	26
3.6.1 <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE	27
3.6.2 Métodos baseados em PCR	27
4 ARTIGO	29
5 DISCUSSÃO GERAL	42
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* compreende 63 espécies descritas sendo *A. baumannii* a de maior importância clínica. O fenótipo de multirresistentes (MDR) tornou-se prevalente em isolados desta espécie fazendo dos carbapenêmicos a classe de primeira escolha para o tratamento das infecções. Contudo, desde o início da década passada, diversos estudos publicaram relatos de surtos causados por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (AbRC) no mundo e no Brasil, inclusive no estado do Rio Grande do Sul, evidenciando a emergência de um problema que toma proporções cada vez mais alarmantes. (1, 2, 3)

Os carbapenêmicos, classe de antibióticos pertencente à família dos β -lactâmicos, foram introduzidos no mercado por volta dos anos 70. Até esta década, o perfil de sensibilidade da maioria das espécies de *Acinetobacter*. era amplo e não apresentava dificuldades no tratamento. Com o surgimento das cepas multirresistentes, os carbapenêmicos tornaram-se a principal escolha e alternativa de tratamento para as infecções causadas por estas cepas. (1) Contudo, nos anos 90, *Acinetobacter* spp. resistentes a esta classe de antibióticos tornaram-se uma realidade. (2)

No gênero *Acinetobacter* spp., o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos pode estar associado à perda de porinas, mas principalmente à produção de carbapenemases. Estas são β -lactamases atividade de hidrólise sobre carbapenêmicos. Segundo Ambler, as carbapenemases podem ser divididas nas classes A, B e D, de acordo com suas características moleculares. A classe D representa a classe das oxacilinases (OXA) e são o principal mecanismo associado a AbRC. Atualmente, das OXA-carbapenemases descritas em *A. baumannii*, as enzimas do tipo OXA-23 são as mais prevalentes. (1, 38)

Técnicas de tipagem molecular são ferramentas de grande importância epidemiológica capazes de estabelecer o grau de similaridade genética entre diferentes isolados bacterianos assim como no monitoramento, caracterização e controle de surtos e infecções em instituições de saúde. Diferentes abordagens de genotipagem são utilizadas para analisar a epidemiologia de *A. baumannii* permitindo a avaliação da disseminação e o entendimento da dinâmica de linhagens clonais, sendo as principais aplicadas em *A. baumannii* as técnicas de REP-PCR e PFGE.

A justificativa do presente estudo se dá pela importância da investigação dos mecanismos envolvidos na resistência ou diminuição de sensibilidade aos antibióticos carbapenêmicos no gênero *Acinetobacter* spp., bem como o conhecimento do seu perfil de

sensibilidade às principais classes de antimicrobianos, considerando que estes dados são escassos no interior do estado do Rio Grande do Sul.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Promover a caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos do gênero *Acinetobacter*. resistentes aos carbapenêmicos, provenientes da Santa Casa de Caridade do município de Uruguaiana/RS.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a perfil de sensibilidade dos *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos (ARC), também aos aminoglicosídeos, fluorquinolonas e outros antimicrobianos como polimixina B;
- Caracterizar fenotipicamente os ARC quanto aos mecanismos enzimáticos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos;
- Avaliar a prevalência dos principais grupos de carbapenemases do tipo oxacilinases nos isolados de ARC;
- Avaliar a contribuição das carbapenemases de classe A e classe B na resistência destes isolados;
- Avaliar a relação clonal entre os isolados de *A. baumannii* através de tipagem molecular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características do gênero *Acinetobacter*

Os microrganismos do gênero *Acinetobacter* (família *Moraxellaceae* e ordem *Gammaproteobacteria*) apresentam-se como coco bacilos gram-negativos, aeróbios, não formadores de esporos, catalase positiva, oxidase negativa e não fermentadores da glicose. Encontram-se amplamente distribuídos em diferentes ambientes como solo, água, vegetais, pele de animais e seres humanos. (1) Atualmente o gênero compreende 63 espécies descritas de acordo com a “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN*” (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>) (acesso em agosto de 2019).

Acinetobacter spp. começaram a ser reconhecidos como patógenos significativos associados à assistência à saúde durante a década de 1970 com muitas das infecções envolvendo isolados MDR e provenientes de unidades de terapia intensiva (UTI). As espécies de maior relevância clínica são *A. baumannii*, *A. nosocomialis* e *A. pittii*. (1, 2) Estas três espécies possuem alto grau de similaridade fenotípica, juntamente da espécie *A. calcoaceticus*, considerada ambiental e raramente patogênica, e devido a isso foram agrupadas no denominado complexo *A. baumannii-calcoaceticus* (ABC). (3) Recentemente as espécies *A. seifertii* e *A. dijkshoorniae* sp. nov, ambas de importância clínica, foram descritas e incluídas no complexo ABC. (4, 5)

3.1.2 Espécie *Acinetobacter baumannii*

Dentre as espécies do complexo ABC, *Acinetobacter baumannii* é a mais relevante clinicamente. (1, 2) Este patógeno oportunista considerado de baixo risco no passado, emergiu mundialmente nas últimas três décadas como uma das principais causas de infecção hospitalar. (2) Além da habilidade de tornar-se resistente a diversas classes de antimicrobianos, *A. baumannii*, assim como outras espécies do gênero, é capaz de manter-se viável por longos períodos em superfícies secas de objetos inanimados, fatores que contribuem diretamente para o sucesso desta espécie como patógeno no ambiente hospitalar. (2)

As infecções causadas por *A. baumannii* podem ser diversas, sendo que as infecções do trato respiratório como as pneumonias associadas à ventilação mecânica são as mais frequentes,

além de infecções do trato urinário, meningites, infecções de pele e tecidos moles, e septicemias. (1, 2)

A contaminação por *A. baumannii* em equipamentos de suporte respiratório, dispositivos de sucção e dispositivos usados para acesso intravascular são considerados uma das principais fontes de infecção. *A. baumannii* também pode ser transmitido pela proximidade com pacientes infectados ou colonizados por contato direto ou mesmo através de fômites, cortinas, grades do leito, mesas, pias, portas, tubos de alimentação e luvas. (2, 6)

Alguns fatores, tais como internação prolongada, uso de ventilação mecânica, de dispositivos intravasculares, idade avançada, imunossupressão, uso prévio de terapia antimicrobiana de amplo espectro, permanência em UTI e alimentação parenteral podem predispor pacientes às infecções por *A. baumannii*. (1, 2, 7)

3.2 Epidemiologia

Estima-se cerca de 45.000 (variando de 41.400 até 83.000) casos por ano de infecções por *Acinetobacter* spp. nos Estados Unidos e um milhão (variando de 600.000 até 1.400.000) casos por ano no mundo todo. (8) Matsui *et al.* após análise de 866 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. procedentes de 76 hospitais do Japão identificaram a espécie *A. baumannii* com sendo a mais prevalente (74.5 %), isolada principalmente de amostras do trato respiratório, seguido de *A. nosocomialis* (9,6 %) e *A. pittii* (6,9 %). (25) Outro estudo avaliou a prevalência de espécies no complexo ABC em 215 amostras de hemoculturas e identificou 54,4 % de *A. baumannii*, 35,8 % de *A. nosocomialis* e 9,8 % de *A. pittii*. (9)

Em um estudo nacional, foram analisados 92 isolados do complexo ABC provenientes de quatro estados diferentes e a prevalência de *A. baumannii* foi de 100%. (10) Em outro estudo, *A. baumannii* representou aproximadamente um terço (22/72) dos isolados relacionados a bacteremias por uso de nutrição parenteral. (11)

As infecções hospitalares por *A. baumannii* estão relacionadas à altas taxas de mortalidade, sendo aproximadamente 26% e podendo aumentar para 46% em UTIs. (12) Em uma pesquisa realizada em países europeus as taxas de mortalidade de *A. baumannii* variaram entre 3% e 67%. (23) *A. baumannii* é o principal patógeno relacionado às pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM), que totalizam cerca de 15% de todas as infecções hospitalares, resultando em altas taxas de morbimortalidade especialmente em UTIs. (13)

Ainda, é responsável por aproximadamente 4 % das meningites, com taxa de mortalidade de 70%. (14)

Infecções por *Acinetobacter* spp. estão frequentemente associadas a episódios de surto envolvendo a disseminação de linhagens clonais no ambiente hospitalar, principalmente em UTIs. Características do gênero *Acinetobacter*, como a capacidade de manter-se viável por longos períodos no ambiente, habilidade de tornar-se resistente a diversos antimicrobianos e a colonização em pacientes saudáveis podem contribuir para este comportamento. (2, 53, 54) Surtos de *A. baumannii* já foram relatados nos Estados Unidos, Europa, América do Sul, África, Ásia e Oriente Médio (15, 16, 17, 18), e inclusive no Brasil. (19, 20, 21, 22)

Em relação a sua prevalência no ambiente, foram analisadas amostras de água, ar e superfícies de diferentes locais de quatro hospitais do Iran e a prevalência de *A. baumannii* foi 17% (7/42), 11% (7/64) e 2% (1/42) respectivamente. (66) Já Rocha *et al.* (2018) analisaram amostras da superfície de leitos de UTI e de um total de 59 isolados, *A. baumannii* foi a espécie mais frequentemente isolada (23,7%). (65) Outro estudo analisou 886 amostras coletadas de UTIs de um hospital universitário na cidade de Porto Alegre/RS, incluindo móveis, dispositivos médicos, luvas e grades dos leitos, e a prevalência encontrada de *A. baumannii* foi de 9,5% ($n=84$), exceto por um isolado, todos foram MDR, (resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano de no mínimo três classes diferentes). (23)

3.3 Resistência aos antimicrobianos

No início dos anos de 1970, as infecções por *Acinetobacter* spp. eram tratadas com ampicilina, gentamicina e ácido nalidíxico. Contudo, a partir do ano de 1975 altas taxas de resistência passaram a ser observadas. (26) Atualmente, vários antimicrobianos como aminopenicilinas, cefalosporinas de espectro restrito e estendido (terceira e quarta geração), tetraciclina, cloranfenicol, cefamicinas, como a cefoxitina e aminoglicosídeos tiveram sua eficácia consideravelmente reduzida no tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp., (27) e o fenótipo MDR tornou-se frequente, representando a grande maioria dos isolados clínicos do gênero. (2, 29, 35)

O contexto da resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii*, é bastante complexo. A espécie é intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos como amoxicilina (penicilinas), cefalosporinas de espectro restrito (primeira e segunda geração), ertapenem, trimetropim e cloranfenicol (27), além de possuir uma configuração genética que favorece a

captação de genes associados a diversos mecanismos de resistência. (1, 2) Além disso, *A. baumannii* também pode expressar mecanismos constitutivos, como bombas de efluxo e a produção de enzimas inativadoras de fármacos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas), que atuando de forma sinérgica, podem torná-lo resistente a praticamente todas as classes de antimicrobianos. Estas características, agindo de forma única ou sinérgica, favorecem diretamente o surgimento de cepas com fenótipo MDR. (28)

Os carbapenêmicos (imipenem e meropenem), devido a sua estabilidade, alta potência contra bacilos gram-negativos e baixa toxicidade, tornaram-se a principal escolha para tratamento de *A. baumannii* MDR. Entretanto, a partir dos anos 90 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (AbRC) passaram a emergir e disseminar-se de forma rápida, tornando-se uma grave ameaça à saúde pública mundial. (1, 2, 6, 7, 29, 30, 31)

Em um estudo norte americano, Hoffman-Roberts *et al.* (2016) analisaram o perfil de 5.582 isolados de *A. baumannii* provenientes de 346 hospitais e identificaram 2.124 isolados MDR, sendo que destes 80% também eram resistentes aos carbapenêmicos. (32) Nos Estados Unidos estima-se cerca de 25.950 casos por ano de infecções por AbRC totalizando 75.000 casos/ano em países desenvolvidos. (8) Infecções por AbRC também representam altos custos para o sistema de saúde ultrapassando U\$389 milhões com aproximadamente 5.000 óbitos anualmente nos Estados Unidos, chegando a quase U\$800 milhões e cerca de 15.000 mortes por ano no mundo todo. (8) Cai *et al.* (2017) avaliaram isolados clínicos procedentes de 206 hospitais e *A. baumannii* foi a espécie que apresentou as maiores taxas de resistência aos carbapenêmicos. No mesmo estudo, a prevalência de AbRC foi de 50.4% em infecções do trato respiratório, 42% em infecções do trato urinário e 40.1% em hemoculturas. (33)

As taxas de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* podem variar de acordo com a distribuição geográfica dos isolados. No Brasil, são observadas taxas muito altas (77,7%) (34) e de acordo com um estudo de Rossi *et al.*, a variação encontrada em *Acinetobacter* spp. entre 2010 e 2014 foi de 30% a 70%. (35)

3.4 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em *Acinetobacter baumannii*

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, como as alterações nas proteínas de ligação às penicilinas, diminuição da permeabilidade da membrana externa através de alterações nas porinas, bomba de efluxo e a produção de β -lactamases. (2)

As β -lactamases são uma família extensa de enzimas codificadas pelo gene “*bla*” cuja classificação mais usual foi proposta por Ambler (1980) baseando-se nas características moleculares das enzimas e dividindo-as em classe A, B, C e D. Seu principal substrato são os β -lactâmicos e seu potencial de ação hidrolítica pode ser bastante variável. A produção destas enzimas é o mecanismo mais frequentemente relatado em *Acinetobacter* spp. (36)

As cefamicinases ou AmpCs, β -lactamases da Classe C de Ambler, são constitutivas, ou seja, naturalmente produzidas no gênero *Acinetobacter* spp. O principal substrato são as cefalosporinas de primeira geração. (37) Já as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), enzimas da Classe A de Ambler, incluem variações das enzimas cefalosporinases que ampliaram sua atividade tornando-se capazes de hidrolisar as cefalosporinas de terceira e quarta geração, bem como outras famílias. Em *A. baumannii* as principais famílias encontradas de ESBL são PER, VEB, GES, TEM, SHV e CTX-M. (2, 36) Enzimas variantes da família GES com espectro de ação estendido aos carbapenêmicos já foram descritas em *A. baumannii*, entretanto sua prevalência é considerada muito baixa. (54)

As carbapenemases são as β -lactamases de mais amplo espectro e potencial de ação e estão divididas nas classes A, B e D de Ambler. São capazes de hidrolisar outros β -lactâmicos mas principalmente os carbapenêmicos (36) Em *A. baumannii*, a diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos está principalmente associada à produção de carbapenemases, sendo as de classe D, ou OXA-carbapenemases, as principais enzimas responsáveis pelo fenótipo de resistência em detrimento das carbapenemases de classe A e B. (1, 2, 6)

Em função da relevância na espécie de interesse deste estudo, só serão abordadas as carbapenemases das classes B e D de Ambler, considerando que até o momento apenas um caso de *A. baumannii*, produtor da KPC, foi descrito mundialmente. As enzimas da Classe A estão principalmente associadas às enterobactérias. (38, 41)

3.4.1 Oxacilinases

As oxacilinases (OXA) são um grupo variado de enzimas β -lactamases que incluem mais de 150 variantes já descritas. Pertencem a classe D de Ambler e recebem este nome por ser a oxacilina seu substrato preferencial. As OXA são comumente codificadas por elementos genéticos móveis, o que colabora diretamente para sua disseminação. Seu espectro de ação hidrolítica pode variar, sendo as OXA capazes de hidrolisar os carbapenêmicos denominadas

OXA-carbapenemases. (38, 40) Isolados clínicos de AbRC expressando OXA-carbapenemases tem sido descrito no mundo todo. (1, 2, 6, 36, 39, 40, 49)

A árvore filogenética das OXA é dívida em dez famílias, ou subgrupos, com base na sequência de aminoácidos e as enzimas que apresentam alta similaridade genética são agrupadas em um mesmo subgrupo filogenético. (39) Atualmente, seis subgrupos filogenéticos de OXA-carbapenemases já foram descritos em *A. baumannii* e estão representados na Tabela 1: enzimas do tipo OXA-51, intrínseca da espécie, e as adquiridas do tipo OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 e OXA-235. Com exceção de OXA-235, todos os subgrupos já foram relatados no Brasil. (49, 50)

Tabela 1 – Subgrupos de OXA-carbapenemases descritas em *Acinetobacter baumannii*

Subgrupo Filogenético	Componentes do grupo	Nº de enzimas no grupo	Localização genômica
OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239	19	Plasmídeo
OXA-24/40-like	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207	7	Plasmídeo
OXA-51-like	OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254	95	Cromossomo
OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164	4	Plasmídeo
OXA-143-like	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255	5	Plasmídeo
OXA-235-like	OXA-235–OXA-237, OXA-278	4	Plasmídeo

Fonte: ASIF *et al.*, 2018 (2); EVANS e AMYES, 2014 (39); POIREL e NORDMAN, 2006 (48).

A primeira OXA-carbapenemase identificada em *A. baumannii* foi a OXA-23 no ano de 1985, interessantemente, no mesmo ano em que o imipenem foi aprovado para uso clínico. É a enzima mais prevalente da família das OXA-23 e está entre as mais frequentemente associadas ao fenótipo de resistência aos carbapenêmicos nesta espécie. (1, 2, 39, 51, 52)

A segunda família de OXA-carbapenemases identificadas em *A. baumannii* no ano de 1997 foi a OXA-24, posteriormente renomeada para OXA-40. As enzimas do tipo OXA-24/40 são menos prevalentes em comparação às do tipo OXA-23. Apenas poucas enzimas do grupo apresentam atividade contra carbapenêmicos suficiente para tornar *A. baumannii* resistente a esta classe, sendo a OXA-40 a mais frequente. (39) Na Europa OXA-24/40 encontram-se disseminadas em *A. baumannii*, contudo no Brasil são poucos os estudos que relataram a presença dessa família. O primeiro relato nacional de *A. baumannii* produtor de OXA-72, uma variante de OXA-24/40, ocorreu no ano de 2010 e, em seguida no ano de 2013 foram descritos isolados de *A. baumannii* com fenótipo extremamente resistentes (XDR) também produtores de OXA-72 em Recife. (53, 54)

As enzimas do tipo OXA-58, descobertas no ano de 2003, também se encontram disseminadas mundialmente. Na América do Sul a presença do gene *bla*_{OXA-58} já foi descrita na Argentina e está frequentemente associada à resistência aos carbapenêmicos em surtos causados por *Acinetobacter* spp. no país. (49) No Brasil, o primeiro relato ocorreu no ano de 2011 na cidade do Rio de Janeiro (50) e em 2012, Gusatti *et al.* relataram a presença da OXA-58 em um isolado de *A. baumannii* procedente de um surto do ano de 2007 na cidade de Porto Alegre. (55)

Em 2004, foram identificados em pacientes brasileiros três isolados de *A. baumannii* resistentes a quase todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, mas negativos para a pesquisa dos genes de carbapenemases já descritos até então. Posteriormente, descobriu-se nestes isolados a presença de uma nova enzima, a OXA-143, que até o momento, foi descrita apenas no Brasil e encontra-se disseminada nas regiões sul e sudeste, principalmente na cidade de São Paulo. (56, 57)

Em 2013, Higgins *et al.* identificaram um novo subtipo de OXA-carbapenemase, a OXA-235-like. (74) Entretanto, estudos cinéticos demonstraram que a OXA-235 possui uma capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos muito mais baixa em comparação às OXA-40 e -58. Este subgrupo, assim como OXA-143, parece estar restrito ao continente americano, tendo sido descrito apenas em isolados dos EUA e México. (39)

Os elementos genéticos móveis como as sequências de inserção desempenham um papel por vezes determinante na resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. Estes elementos demonstraram a capacidade de poder ativar e ou aumentar a expressão de genes da sua vizinhança. Em *A. baumannii*, os IS*Aba* são sequências de inserção que estão frequentemente associadas a expressão dos genes de OXA-carbapenemases. Além da presença,

a posição destas sequências também pode influenciar na expressão de genes. Para conferir resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* o elemento IS*Aba1*, o mais prevalente na espécie, precisa estar a montante dos genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}. IS*Aba1* já foi identificado em associação com diferentes oxacilinases, tais como os *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-235}. (39, 40)

3.4.2 Metallo-β-lactamases (MBL)

As carbapenemases da classe B de Ambler, ou MBLs, caracterizam-se por não serem afetadas pelos inibidores clássicos de β-lactamases, como o ácido clavulânico e tazobactam, e são sensíveis à inibição pelos quelantes de metais, como o EDTA, o ácido mercaptopropiônico e o ácido dipicolínico. (42) Muitas enzimas têm sido detectadas nos últimos anos e, até o momento, 12 famílias já foram descritas: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, DIM, AIM, NDM, KHM, SMB, TMB e FIM. Embora geralmente reportadas em enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*, quatro famílias de MBLs já foram caracterizadas em *A. baumannii*, sendo VIM, SIM, IMP e NDM (43), dos quais as duas últimas também já foram identificadas entre isolados brasileiros. (44, 45)

A New Delhi metallo β-lactamase (NDM) é uma enzima que tem se disseminado rapidamente por todos os continentes e, embora apresente uma maior prevalência em isolados de enterobactérias, tem sido detectada frequentemente em isolados de *Acinetobacter* spp., representando um risco emergente de disseminação neste gênero. Sua presença já foi, inclusive, reportada em coexistência com a OXA-23 em isolados de *A. baumannii* (46, 52). No Brasil, NDM é motivo de grande preocupação, visto que, após um ano da chegada NDM no país em 2013 (47), quatro estados, incluindo o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio de Janeiro, já confirmaram a detecção de isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de NDM-1. (45) Mais recentemente, um estudo nacional identificou a presença do gene *bla*_{NDM} em um isolado de *A. pittii* coletado no ano de 2012, demonstrando que esse gene estava presente no território brasileiro antes da data da primeira publicação. (77) Atualmente a prevalência da NDM em isolados do gênero *Acinetobacter* spp. é consideravelmente mais baixa, em comparação às OXA-carbapenemases, sendo detectada principalmente nas espécies *A. baumannii* e *A. bereziniae*. (78)

3.5 Detecção fenotípica de carbapenemases

A detecção das carbapenemases em isolados resistentes aos carbapenêmicos é um passo fundamental que pode auxiliar de forma rápida na tomada de decisões relacionadas à terapia farmacológica bem como na contenção da disseminação destes microrganismos. Diversos testes fenotípicos já foram descritos e validados para a identificação qualitativa da produção e presença de carbapenemases em bacilos gram negativos. Podem ser destacados o método de inativação de carbapenêmicos modificado, do inglês *modified carbapenem inactivation method* (mCIM), teste de Carba-NP, teste de Blue-Carba, os métodos baseados na inativação enzimática através de inibidores clássicos e mais recentemente, as técnicas baseadas em ionização/dessorção à laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo, do inglês *matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-fly mass spectrometry* (MALDI-TOF). (75, 76)

Estes métodos diferenciam-se em vários aspectos, desde o valor de custo, o equipamento necessário para execução, até ao tempo de resultado, que pode ser de horas ou, no caso dos testes que levam em consideração o crescimento do microrganismo, levar até mais de 24 horas para ser obtido. Também podem apresentar limitações relacionadas à interpretação, por vezes subjetiva, bem como a falta de padronização para determinados gêneros ou espécies bacterianas. (76) As carbapenemases das classes A e B, em geral, não apresentam dificuldade de serem identificadas na maioria dos testes fenotípicos preconizados, devido à alta capacidade hidrolítica associada a estas enzimas. Por outro lado, para as OXA, enzimas com menor ação hidrolítica, os resultados fenotípicos, em muitos casos, são duvidosos ou falso-negativos, apresentando baixa sensibilidade e especificidade. (75, 76)

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e mais recentemente o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) preconizam o teste com inibidores específicos, ácido fenilborônico (AFB) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), como triagem para a pesquisa das carbapenemases das classes A e B, respectivamente. No teste, o microrganismo é inoculado em uma placa de ágar MH na qual são dispensados discos de imipenem e meropenem, combinados com soluções de AFB e EDTA cada um, e discos não combinados, contendo apenas o princípio ativo antimicrobiano. Os discos associados ao inibidor inibem a enzima presente, permitindo a ação do antibiótico e apresentando um halo de inibição maior quando comparado aos halos de inibição dos discos sem inibidores. (85, 87) Este teste possui baixo custo e facilidade de execução, apresentando sensibilidade de 96,8–100% e

especificidade de 98,8–100% e, por isso, pode ser considerado uma excelente opção de escolha para detecção fenotípica de carbapenemases. (88)

No caso das OXA-carbapenemases, por não possuírem inibidores clássicos, estas não são detectadas através de testes de associação como o descrito acima. Para tanto, o teste de Blue-Carba pode ser considerado uma alternativa. Este teste possui baixo custo e execução relativamente simples contando inclusive com opções comerciais já disponíveis (e.g. *Rapid CARB Blue Kit*®, ROSCO). Apesar do seu resultado levar em consideração apenas a presença e não a classe da carbapenemase produzida, o teste possui sensibilidade suficiente para detecção das OXA-carbapenemases, com especificidade e sensibilidade de 100%. (86) No teste são utilizadas duas soluções aquosas de azul de bromotimol: Solução Teste, na qual é adicionado sulfato de zinco e imipenem, e solução Controle Negativo, contendo apenas azul de bromotimol. O microrganismo é inoculado em ambas as soluções, e incubado por duas horas. O resultado é observado através da mudança de coloração na Solução Teste, que deve ser diferente da coloração da solução Controle Negativo e o tempo de resposta varia para cada tipo de carbapenemase, sendo de aproximadamente 30 minutos para as KPCs e MBLs, e de uma hora e meia a duas horas para as do tipo OXA. (86)

Na prática clínica, a pesquisa de carbapenemases é preconizada quando isolados são resistentes aos carbapenêmicos nos testes de sensibilidade antimicrobiana. Embora a sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos possa variar entre as espécies e entre as classes de carbapenemases, sua realização faz parte de uma triagem de extrema importância para o desfecho clínico do caso. Para a confirmação dos resultados positivos na triagem fenotípica de carbapenemases, tem-se como “padrão ouro” a identificação do gene associado a produção da enzima, que pode ser realizado por técnicas de biologia molecular através da pesquisa de alvos moleculares como os genes ou elementos genéticos. (76)

3.6 Tipagem molecular

A tipagem baseia-se na capacidade de agrupar indivíduos de acordo com características comuns através de técnicas que podem ser bastante variadas. Em bacteriologia, a tipagem molecular desempenha um papel de grande importância epidemiológica capaz de estabelecer o grau de similaridade genética entre diferentes isolados bacterianos assim como no monitoramento, caracterização e controle de surtos e infecções em instituições de saúde. (60)

Os métodos de tipagem podem ser fenotípicos ou genotípicos e são caracterizados conforme sua reprodutibilidade, poder discriminatório e facilidade de execução. Testes genotípicos levam em consideração aspectos moleculares e devido à alta capacidade discriminatória apresentam resultados mais satisfatórios. Diferentes abordagens de genotipagem são utilizadas para analisar a epidemiologia de *A. baumannii*, destacando-se os métodos baseados em PCR (RAPD e REP-PCR), ribotipagem, análises do padrão de restrição do DNA como as técnicas *pulsed field gel eletrophoresis* (PFGE), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *multilocus sequence typing* (MLST) e, recentemente, o sequenciamento completo do genoma. (59, 60)

3.6.1 Pulsed-Field Gel Eletrophoresis – PFGE

Na tipagem bacteriana, a técnica de eletroforese em campo pulsante, do inglês *pulsed-field gel eletrophoresis* (PFGE) é utilizada para separar grandes fragmentos de DNA obtidos pela digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas endonucleases de restrição de baixa frequência de corte. Devido a seu tamanho (10 Kb – 10 Mb), a separação destes fragmentos não é possível por técnicas de eletroforese convencionais, sendo necessário o uso de PFGE que por meio de campos elétricos alternados em diferentes ângulos consegue migrar grandes fragmentos de DNA em gel de agarose. (59) A técnica de digestão ou macrorestrição do DNA seguida de PFGE destaca-se como o método mais reprodutível e de maior poder discriminatório e, portanto, considerada por muito tempo a técnica “padrão-ouro” para tipagem molecular de muitas espécies bacterianas. Contudo, é uma técnica laboriosa, de alto custo e tempo de execução, o que limita bastante sua aplicabilidade. (60) Apesar disso, a técnica foi por muito tempo considerada “padrão-ouro” para tipagem de *A. baumannii*, papel atualmente desempenhado pelo sequenciamento completo do genoma, e utilizada em diversos estudos para avaliação da dinâmica clonal em surtos causados por AbRC a níveis institucionais, nacionais e até mesmo mundiais. (11, 25, 27, 31, 52, 59, 60, 61, 63)

3.6.2 Métodos baseados em PCR

Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido frequentemente utilizados para tipagem de isolados de *Acinetobacter* spp. Estas técnicas possuem a vantagem de não necessitarem de equipamentos especializados, apresentarem baixo custo, maior

facilidade e rapidez na execução. Entretanto, sua capacidade discriminatória e reprodutibilidade são inferiores em comparação à técnica de PFGE. (60)

Estes métodos baseiam-se na utilização de um ou mais *primers* que se complementam a sequências ou elementos repetidos no DNA genômico presentes em algumas espécies e gêneros bacterianos, que após a PCR geram *amplicons* de diferentes tamanhos resultando em um padrão específico de bandas, ou *fingerprint* do DNA bacteriano. Os principais elementos repetidos utilizados na tipagem de *Acinetobacter* spp. são as sequências palindrômicas extragênicas repetidas, do inglês *repetitive extragenic palindromic sequence* (REP) e as sequências repetitivas enterobacterianas intergênicas de consenso, do inglês *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC). (59)

A REP-PCR tem sido considerada por vários estudos uma alternativa eficiente para a tipagem de *A. baumannii*, demonstrando potencial discriminatório satisfatório em comparação ao obtido pela técnica de PFGE. (11, 45, 60, 61, 64) Em 2000, Bou *et al.* investigaram a relação genética entre isolados de *A. baumannii* de um episódio de surto em hospital de Madrid por meio das técnicas de REP-PCR e PFGE. (62) O poder discriminatório da técnica de REP-PCR foi equivalente a técnica de referência PFGE. Em outro estudo, a REP-PCR foi utilizada para tipagem de isolados de *A. baumannii* relacionados a bacteremias e os resultados tiveram uma ótima correção com os obtidos pela técnica de MLST, um dos métodos mais usuais para estudo de populações genéticas e também bastante usual na tipagem desta espécie. (81)

4 ARTIGO

Parte dos resultados obtidos neste trabalho bem como a descrição do material e método aplicados nas análises estão contidos no manuscrito apresentado a seguir e intitulado “Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from western border region of Rio Grande do Sul state”, que será submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology*.

1 TITLE PAGE

1.1 TITLE

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF CARBAPENEM-RESISTANT *Acinetobacter baumannii* FROM WESTERN BORDER REGION OF RIO GRANDE DO SUL STATE

Gabriel de Paula Gollino ^{1,a}; Bruna Machado Escobar ¹; Ilson da Silveira Dias ²; Rosa Helena Robales Siqueira ², Joseane Cristina Ferreira ³; Ana Lúcia da Costa Darini ³; Vanessa Bley Ribeiro ¹

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Microbiana – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguai/RS;

²Biosul Análises Clínicas, Uruguai/RS;

³Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular – Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

Corresponding author:

Gabriel de Paula Gollino

ggollino@gmail.com

Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

BR 472 - Km 585 - Caixa Postal 118 - Uruguai, RS - CEP 97501-970

1.2 ABSTRACT

Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* has reached extremely high levels worldwide and class D OXA-type carbapenemases are the main associated mechanism. OXA-23 enzymes are considered to be the most prevalent, often associated with ICU outbreak strains. The aim of this study was to evaluate the phenotypic and molecular profile of clinical carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates from a southern Brazilian border region. *A. baumannii* species was identified by the presence of the *bla*_{OXA-51} gene and the susceptibility profile was determined by broth microdilution. The main carbapenemases were investigated by PCR and the typing of the CRAb isolates was performed by PFGE. During the study period, a total of 36 CRAb were recovered, 71.4% from respiratory tract samples from ICU patients. High level resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones were found in contrast to polymyxin B, for which all of CRAb were susceptible. The *bla*_{OXA-23} gene was present in 34 isolates and was the only one detected other than *bla*_{OXA-51}. Molecular typing revealed the presence of four clonal strains, two of them endemic throughout the study period. To the best of our knowledge, our study brings the first data about resistance profile in *Acinetobacter* in the western border of Brazil and make aware of endemic clones of CRAb-producing-OXA-23 in this region of state, contributing for the construction of the national epidemiologic scenario of CRAb.

1.3 KEYWORDS

Carbapenem-resistant *Acinetobacter-baumannii*, carbapenemases, OXA-23, molecular typing, PFGE

2 TEXT

2.1 INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii, a well-established pathogen worldwide, is responsible for several outbreaks and nosocomial infections with high levels of morbidity and mortality worldwide [1-3]. Isolates with multi-drug resistance (MDR) phenotype have become highly prevalent and the emergence of mechanisms that confer resistance to carbapenems, make the treatment infections a worrying challenge [2].

The major mechanism responsible for carbapenem resistance in *A. baumannii* is due to OXA-carbapenemases producing and less frequently due to Class B carbapenemases [1]. The OXA enzymes commonly described in *A. baumannii* are divided in 6 subfamilies, comprising the intrinsic OXA-51-like and the acquired OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143 and OXA-235, all of them already reported in Brazil, except the OXA-235 [4, 5]. The *bla*_{OXA-23-like} gene is the most frequently reported in clinical isolates of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAb) worldwide [1, 2]. The first case reported in Brazil was in 2003 in Curitiba city, and since then, there was a nationwide spread [4-6]. In a recent study including CRAb clinical isolates from four Brazil states, 87% (*n*=80) were positive for the presence of the *bla*_{OXA-23-like} gene [7]. Regarding that data about bacterial resistance are still rare in some regions of the country, the aim of this study was to determinate the susceptibility profile and investigate the molecular epidemiology of CRAb clinical isolates provided from a single hospital of the western border of Rio Grande do Sul state, in southern Brazil.

2.2 METHODS

2.2.1 Bacterial isolates

A total of 39 non-duplicated clinical isolates of *Acinetobacter* spp., resistant or with reduced susceptibility to carbapenems by disk-diffusion method were selected. They were recovered from a bank of clinical isolates constituted as part of a surveillance study on carbapenem resistance in the western border of the Rio Grande do Sul state, from May 2014 to December 2018, including gram-negative bacilli from community and hospital. The 39 isolates, previously identified as *Acinetobacter* spp., had their identification confirmed by conventional techniques (cocci/bacilli in gram staining, catalase and oxidase reactions and fermentation on TSI agar) and after they were submitted to PCR for *bla*_{OXA-51-like} gene to identify *A. baumannii* isolates [8].

2.2.2 Susceptibility profile

Broth microdilution was performed for *A. baumannii* isolates to confirm the susceptibility profile to carbapenems. The isolates resistant to IPM and/or MER, designated as CRAb, were also evaluated against ceftriaxone, ceftazidime, cefepime (CFP), amikacin (AMI), gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP), and polymyxin B (POL). MICs were interpreted according to *Clinical and Laboratory Standards Institute* breakpoints

[9]. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains.

2.2.3 Carbapenemase detection

Carbapenemase-encoding genes, including the main OXA-types, were investigated by conventional PCR for CRAB, as previously described (Table 1). The amplified PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels in a 0.5 X tris-borate-EDTA buffer, stained with SYBR safe, using the photo documentation Alphamager HP (ProteinSimple, USA) system. The *E. coli* ATCC strain 25922 was used as negative control.

2.2.4 Genotyping

The genetic relationship among CRAB isolates were performed using the enzymatic restriction with *ApaI* (Thermo Scientific, USA) followed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Fragments were separated on 1.5% (w/v) agarose gel in a 0.5 X tris-borate-EDTA buffer for 23 h at 14 °C using a pulse ramp rate changing from 5s to 35 s, at 6 V/cm in the CHEF-DRIII System (Bio-Rad, USA) apparatus. The restriction patterns were analyzed by GelJ software (version 2.0), with Dice similarity coefficient and the unweighted-pair group method using average linkage (UPGMA) algorithm with 1.5 % band matching tolerance. Genetic and clonal relatedness were established for similarity values $\geq 85\%$ and $\geq 99\%$, respectively. [14]

2.3 RESULTS

All the 39 isolates tested were positive for the *bla*_{OXA-51} gene, however only 36 were confirmed as CRAB by broth microdilution. The majority of CRAB isolates were from clinical samples from ICU's patients ($n=21$) and isolated from respiratory tract specimens ($n=15$) (Table 2). The isolates susceptibility profile is show in Table 2. In addition to carbapenems, CRAB isolates were also resistant to third generation cephalosporins (data not shown), cefepime and quinolones. Thirty-one were classified as MDR (non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories). [15]

The molecular analysis revealed the presence of *bla*_{OXA-23-like} gene in 34 CRAB. None of the other genes searched were detected among the isolates. *ApaI*-PFGE dendrogram of CRAB evidenced the presence of three clusters (I to III) and three singletons. The main cluster (I) included 17 isolates distributed from 2014 to 2018 and two main clonal lineages strains, type A ($n=9$) and A1 ($n=5$). Cluster II included 13 isolates and two clonal lineages, B and B1, that appeared more recently, in 2017. In the cluster III ($n=3$) only isolates collected in 2016 were present. Two of the three singletons represented the isolates 1ST and 16A, both non-carriers of the *bla*_{OXA-23-like} gene (Table 2).

2.4 DISCUSSION

Antimicrobial resistance in *A. baumannii*, particularly to carbapenems, has reached alarming levels worldwide and the spread of CRAb became frequently reported, mainly due to the dissemination of OXA-23-like producing strains [1]. In Brazil, the carbapenem resistance rate in *Acinetobacter* spp. reaches almost 80%, according to the National Health Surveillance Agency [16], and OXA-23 producing CRAb are associated with several outbreaks and high mortality rates in ICUs [17, 18].

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most frequently acquired infection in ICUs, with incidence rate ranging from 5% to 67% [26]. *A. baumannii* recovered from endotracheal aspirates and bronchoalveolar lavage is one of the most prevalent pathogens associated to VAP often involving MDR strains [27]. In the present study, 71.4% of ICU isolates were recovered from respiratory tract samples. A high prevalence (70.6%/ $n=29$) of OXA-23-producing CRAb associated to VAP were also demonstrated in a national study involving isolates provided from endotracheal aspirates from ICU patients [25].

Although the majority of CRAb isolates evaluated in this study was MDR ($n=31$) all of them were sensitive to polymyxin B. Polymyxins play an important role in the treatment of CRAb infections due to the limited therapeutic options available [1]. Despite the low MIC values (≤ 1.0 $\mu\text{g/mL}$) found to POL in this study, it is quite likely that this profile may change in a next future as consequence of its increased therapeutic use in recent years. Resistance to polymyxins in *A. baumannii* has already emerged and has been of great concern worldwide [19]. Even national studies have found high level resistance to polymyxins (4.0-64 $\mu\text{g/mL}$) among *A. baumannii* isolates [7, 24]. Aminoglycosides have proved to be a great therapeutic option when susceptibility permits [1], however high-level resistance to these drugs were also observed among CRAb, with only five isolates sensitive to gentamicin and two to amikacin. Indeed, but due to the toxicity in prolonged uses, they are commonly combined with other antimicrobials such as colistin and β -lactams to treat MDR *A. baumannii* [2, 3]. In recent years, different resistance mechanisms to these drugs have emerged leading to a considerable decrease in susceptibility in *A. baumannii* isolates worldwide. [32, 33].

The susceptibility profile also revealed a considerable increase in MIC values over the years, mainly for β -lactams. It could be related to an overexpression of intrinsic genes like *bla*_{ADC}, responsible for conferring natural resistance to narrow-spectrum cephalosporins [20]. Although broad-spectrum cephalosporins are not hydrolyzed by class D carbapenemases, ceftazidime and cefotaxime resistance in OXA-23-producing *A. baumannii* isolates were assigned to AmpC overproduction. The association of other mechanisms, such as the overexpression of *adeABC* efflux systems should also be considered, as they can contribute for the increasing meropenem and ceftazidime MICs [31].

*Bla*_{OXA-23-like} gene was responsible for resistance phenotype found in 94.4% of the CRAb isolates. In 2014, a study performed in the capital of state, far 600 km from the western border, showed that OXA-23 was the main resistance mechanism associated to CRAb, remaining widespread five years after the first outbreak in the city [28]. Recent studies confirm a high prevalence of OXA-23-producing CRAb associated with high mortality rates in ICUs in different Brazilian cities [7, 17, 18].

The isolates 16A and 1ST were negative for the presence of all carbapenemase-encoding genes screened, except for the *bla*_{OXA-51-like}. A study by Turton *et al.* have shown that this gene, besides to be constitutive of the species, may be related to high MICs for carbapenems depending on the presence of the insertion elements, as *ISAb1* [20] and some studies have already demonstrated carbapenem resistance only in isolates carrying *bla*_{OXA-}

^{51-like} gene upstream to *ISAbal* [17, 29, 34]. By the other hand, another one evidenced the presence of *ISAbal* upstream to *bla_{OXA-51}* gene in carbapenem-susceptible *A. baumannii* isolates suggesting that this association is not enough to confer resistance to carbapenems [30]. In addition, carbapenem-resistance phenotype in 16A e 1ST may also be related to the presence of other OXA types, such as OXA-58 or even other enzymes not investigated here.

Outbreaks due to CRAB in this hospital have occurred since 2014, when we initiated the epidemiologic surveillance study of carbapenem resistant in gram negative bacilli. Our data evidenced the prevalence of two major clonal lineages (type A and A1) as well as the emergence of new ones (type B and B1), since 2017. Several studies have described outbreaks caused by a single clone in a same institution although polyclonal outbreaks are not rare [23]. Until the moment, in 2018 was registered the highest number of cases of CRAB in the last five years. *A. baumannii* has the ability to survive on environmental surfaces for long periods, making transmission difficult to control. This feature is directly associated to the hospital outbreaks [22]. For a more dynamic and comprehensive epidemiological understanding, it would be interesting to carry out typing by MLST in order to check whether the clones found are endemic in Brazil or even Latin America or whether represent a distinct and peculiar profile of the border region.

In conclusion, our results provide the first data on the local epidemiology of *Acinetobacter* resistance, evidencing the spread and permanence of OXA-23-producing *A. baumannii* with high level resistance to β -lactam, quinolones and aminoglycosides. The genetic typing revealed the permanence of two endemic lineages clonally related in the hospital, accompanied by the spread of polyclonal strains, highlighting that CRAB is a worrisome challenge not only restricted to large health centers. Thereby, the understanding of resistance mechanisms and local epidemiology provide important tool in order to improve the appropriate treatment for serious infections, contributing for control and prevention of infections caused by CRAB.

3 COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

3.1 Funding information

This study was funded by INPRA (Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência à Antimicrobianos - INCT/CNPq, 465718/2014-0) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 23038.014292/2018-73). Author Gabriel de Paula Gollino has received research grant (88887.145943/2017-00) from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

3.2 Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

3.3 Ethical approval

The project is registered in the Sistema de Informação de Projetos de Pesquisa, Ensino e Extensão (SIPPEE) of the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) under number 12.243.16.

3.4 Consent for publication

Not applicable

4 RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

5 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Gabriel de Paula Gollino and Vanessa Bley Ribeiro.

Methodology: Gabriel de Paula Gollino, Ana Lúcia da Costa Darini, Joseane Cristina Ferreira and Vanessa Bley Ribeiro

Validation: Gabriel de Paula Gollino and Joseane Cristina Ferreira.

Formal Analysis: Gabriel de Paula Gollino and Vanessa Bley Ribeiro.

Investigation: Gabriel de Paula Gollino, Bruna Machado Escobar, Rosa Helena Robales Siqueira and Joseane Cristina Ferreira.

Resources: Ilson da Silveira Dias, Ana Lúcia da Costa Darini and Vanessa Bley Ribeiro.

Data Curation: Gabriel de Paula Gollino, Bruna Machado Escobar and Vanessa Bley Ribeiro.

Writing – Original Draft Presentation: Gabriel de Paula Gollino.

Writing – Review and Editing: Gabriel de Paula Gollino, Ilson da Silveira Dias, Ana Lúcia da Costa Darini, Joseane Cristina Ferreira and Vanessa Bley Ribeiro.

Visualization: Gabriel de Paula Gollino and Vanessa Bley Ribeiro.

Supervision: Vanessa Bley Ribeiro.

Project administration: Vanessa Bley Ribeiro.

Funding acquisition: Vanessa Bley Ribeiro.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to Dr. Afonso Luis Barth, PhD, for the control strains provided and to the LEBEM team coordinated by Dra. Ana Lúcia Darini for the support in PFGE performance. We also thank to Dra. Luciana de Souza Nunes and the students Caroline Biterncourt and Luísa Quatrin Giacomini for their contribution for this work.

7 REFERENCES

1. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B (2017) Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin Microbiol Rev 30:409–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
2. Asif M, Alvi IA, Rehman SU (2018) Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance

mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect Drug Resist* 11:1249–1260.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>

3. Wang X, Qin LJ (2019) A review on *Acinetobacter baumannii*. *J Acute Dis* 8:16-20.
<https://doi.org/10.4103/2221-6189.250373>

4. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, González-Rocha G (2012) OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* 6:311–16.
<https://doi.org/10.3855/jidc.2310>

5. Figueiredo DQ de, Santos KRN dos, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CRV de, Teixeira, LM, Mondino SS B de (2011) First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(3), 368-370.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300019>

6. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N (2003) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 41(7):3403-6.
<https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3403-3406>

7. Rocha L, Pagano M, Campos JC, Sampaio JLM, Martins AF, Barth AL (2017) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. *J Bras Patol Med Lab* 53(6), 358-361.
<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170057>

8. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL (2006) Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 44(8):2974–2976.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01021-06>

9. CLSI (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

10. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:351–3.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>

11. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H (2010) Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(3): 305.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014>

12. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(3):622–632.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.3.622-632.2000>

13. Bogaerts P, Rezende de Castro R, de Mendonça R, Huang T-D, Denis O, Glupczynski Y (2013) Validation of carbapenemase and extended-spectrum β-lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189, *J Antimicrob Chemother* v68, i7, p1576–1582.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt065>

14. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M (2008) Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 14, Issue 2, 161 - 167.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01911.x>

15. Magiorakosa AP, Srinivasanb A, Careyb RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, M.J. Struelens MJ, Vatopoulos A, Weberb

- JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 18, Issue 3, 268 – 281.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
16. ANVISA - National Health Surveillance Agency (2019) Patient Safety and Quality of Health Services Newsletter. <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-segurancado-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude>
17. da Silva KE, Maciel WG, Croda J, Cayo R, Ramos AC, de Sales RO, Kurihara MNL, Vasconcelos NG, Gales AC, Simionatto S (2018) A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS ONE* 13(12): e0209367.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209367>
18. Royer S, de Campos PA, Araújo BF, Ferreira ML, Gonçalves IR, Batistão DWDF, Brígido RTES, Cerdeira LT, Machado LG, de Brito CS, Gontijo-Filho PP, Ribas RM (2018) Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla*OXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 13(6):e0198643.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198653>
19. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N (2012) Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother* v67, i7, p1607–1615.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks084>
20. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL (2006) The role of ISaba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 258:72-77.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>
21. Evans BA, Amyes SGB (2014) OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27(2), 241–263.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
22. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM (1998) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36(7), 1938–1941.
23. Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L, NISC Comparative Sequence Program, Murray PR, Segre JA (2011) Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *P Natl Acad Sci USA* 108:13758-13763.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1104404108>
24. Genteluci GL, Gomes DBC, Souza MJ de, Carvalho KR, Villas-Bôas MHS (2016) Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. *J Bras Patol Med Lab* 52(2), 91-95.
<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160021>
25. Royer S, Faria AL de S, Seki LM, Chagas TPG, Campos PA de, Batistão DW da F, Asensi MD, Gontijo F, Paulo P, Ribas R (2015) Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *Braz J Infect Dis* v19, n4, pp350-357.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>
26. Timsit JF, Esaied W, Neuville M, Bouadma L, Mourvillier B (2017) Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000Res* 6:2061.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.12222.1>
27. Čiginskienė A, Dambrauskienė A, Rello J, Adukauskienė D (2019) Ventilator-Associated Pneumonia due to Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Mortality Relation with Resistance Profiles, and Independent Predictors of In-Hospital Mortality. *Medicina (Kaunas)* 13;55(2):49.
<https://doi.org/10.3390/medicina55020049>

28. Mariana P, Luciana SN, Marina N, Afonso LB, Andreza FM (2019) Comparative Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Types in Southern Brazil: From the First Outbreak (2007–2008) to the Endemic Period (2013–2014). *Microb Drug Resist* 25:4, 538-542.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0262>
29. Khurshid M, Rasool MH, Ashfaq UA, Aslam B, Waseem M (2017) Emergence of ISAbal harboring carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Pakistan. *Future Microbiol* 12(14), 1261–1269.
<https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0080>
30. Pagano M, Martins A, Machado A, Barin J, Barth AL (2013) Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect*, 141(2), 330-333.
<https://doi.org/10.1017/S095026881200074X>
31. Cardoso, JP (2013) Contribuição da hiperexpressão do sistema de efluxo AdeABC e da hiperprodução de AmpC na resistência aos β -lactâmicos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* produtores de OXA-23 no Brasil. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia. Departamento de Medicina, Disciplina de Infectologia.
32. Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, Zarei F, Tanomand A (2014) Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Jundishapur J Microbiol* 7(10):e11924.
<https://doi.org/10.5812/jjm.11924>
33. Shafigh M, Rajabnia R, Yahyapour Y, Shahandashti EF, Khafri S, Namvar AE (2018) Evaluation of Aminoglycoside Resistance Genes in *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Different Parts of Babol Hospitals. *Biomed J Sci & Tech Res* v8, i4.
<https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.08.001675>
34. Yazdansetad S, Najari E, Ghaemi EA, Javid N, Hashemi A, Ardebili A (2019) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying the blaOXA genes with an upstream ISAbal: The first report of a novel OXA subclass from Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 18, 95–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.011>

Table 1**Sequence of primers used to detect carbapenemase-encoding genes**

Target	Primer	Sequence (5' to 3') ¹	Amplicon size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51f	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353	10
	OXA-51r	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
<i>bla</i> _{OXA-143}	OXA-143f	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	11
	OXA-143r	TAATCCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>bla</i> _{GES}	GESf	ATGCGCTTCATTACGCAC	860	12
	GEZr	CTATTTGTCCGTGCTCAGG		
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23f	CCC CGA GTC AGA TTG TTC AAG G	330	
	OXA-23r	TAC GTC GCG CAA GTT CCT GA		
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24f	GCA GAA AGA AGT AAA RCG GGT	271	
	OXA-24r	CCA ACC WGT CAA CCA ACC TA		
<i>bla</i> _{KPC}	KPCf	TCG CCG TCT AGT TCT GCT GTC TTG	353	
	KPCr	ACA GCT CCG CCA CCG TCA T		
<i>bla</i> _{NDM}	NDMf	ACT TGG CCT TGC TGT CCT T	603	13
	NDMr	CAT TAG CCG CTG CAT TGA T		
<i>bla</i> _{IMP}	IMPf	ACA YGG YTT RGT DGT KCT TG	387	
	IMPr	GGT TTA AYA AAR CAA CCA CC		
<i>bla</i> _{VIM}	VIMf	TGT CCG TGA TGG TGA TGA GT	437	
	VIMr	ATT CAG CCA GAT CGG CAT C		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48f	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG	265	
	OXA-48r	CAT CCT TAA CCA CGC CCA AAT C		

Table 2

Genotype and phenotype profile of CRAb isolates

<i>ApaI</i> -PFGE type	Isolate	Clinical Specimen ^a	Year of collection	MIC (µg/mL) ^b						
				CPM (R ≥ 32)	IPM (R ≥ 8)	MER (R ≥ 8)	AMI (R ≥ 64)	GEN (R ≥ 16)	CIP (R ≥ 4)	POL (R ≥ 4)
E	16A*	Blood	2017	32	16	32	64	4	64	0,5
D	1ST	Catheter	2014	32	16	1	256	>256	>64	0,5
F	30A*	OTS	2018	>256	32	256	256	32	>256	0,5
C2	3A	Wound secretion	2016	32	8	32	128	2	32	0,5
C1	2A	Wound secretion	2016	32	8	32	128	2	32	1
C	1A	BAL	2016	32	8	16	64	1	32	0,5
B4	24A*	OTS	2018	>256	16	64	128	16	>256	0,5
B1	35A*	OTS	2018	>256	16	128	256	16	>256	0,5
	31A*	Tracheal Secretion	2018	128	16	64	256	16	>256	0,5
	17A*	OTS	2017	32	16	32	64	2	32	0,5
B3	13A	Wound secretion	2017	32	16	64	64	256	64	1
B2	9A*	OTS	2017	32	16	32	32	256	64	0,5
B	21A*	OTS	2018	256	32	128	256	32	16	0,5
	19A*	Catheter	2018	32	16	32	32	256	32	0,5
	14A	OTS	2017	32	16	64	64	256	64	0,5
	26A*	OTS	2018	>256	32	64	128	>256	>256	0,25
	25A*	OTS	2018	>256	32	128	128	>256	>256	0,5
	18A*	Tracheal Secretion	2017	32	16	32	32	128	32	0,5
	5A*	OTS	2017	16	16	32	64	256	64	0,25
A4	9ST	OTS	2014	16	32	64	32	>256	>64	0,5
A3	8ST	Wound secretion	2014	32	16	32	32	>256	>64	0,5
A2	19ST	Wound secretion	2015	64	16	8	2	128	64	0,5
A1	21ST	OTS	2015	32	32	64	32	>256	64	0,5
	12ST*	BAL	2014	32	32	64	32	>256	32	0,5
	33A	Sputum	2018	128	16	128	128	>256	>256	0,25
	6ST*	Cerebrospinal fluid	2014	32	16	64	32	>256	32	0,5
	3ST*	OTS	2014	64	32	32	32	>256	16	1
	2ST	OTS	2014	64	32	64	32	>256	32	0,5
	27A	Wound secretion	2018	>256	16	64	64	>256	>256	0,5
	20A*	Urine	2018	>256	16	64	128	>256	>256	0,5
	28A*	Sputum	2018	>256	16	64	128	>256	>256	0,5
A	16ST*	BAL	2014	32	8	8	2	>256	>64	0,5
	13ST	OTS	2015	32	128	32	64	>256	32	0,5
	29A	OTS	2018	>256	16	64	64	>256	>256	0,25
	11ST*	Catheter	2014	16	32	32	32	>256	32	0,5
	8A*	OTS	2017	16	32	64	32	>256	64	0,5

Typing obtained by *ApaI*-PFGE digestion. Dendrogram displaying the genetic relatedness for all *bla*_{OXA-51-like} gene producing isolate constructed using Dice coefficient with 1,5 % band matching tolerance and UPGMA for clustering.

*) ICU patient.

^a) OTS: Orotracheal tube secretion; BAL: Bronchoalveolar lavage.

^b) Resistance MIC interpretation according to CLSI 2018 [9]. AMI: Amicacin; CIP: Ciprofloxacin; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicin; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; POL: Polymixin B.

5 DISCUSSÃO GERAL

Historicamente, o gênero *Acinetobacter* começou a ser isolado na década de 1920, contudo somente a partir da década de 1970 que *Acinetobacter* spp. passaram a ser reconhecidos como patógenos de importância clínica. O rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência associado a outras características logo fez do gênero, e principalmente da espécie *A. baumannii*, um dos mais preocupantes no contexto da saúde pública e hospitalar. Atualmente, cepas de *A. baumannii* MDR e AbRC encontram-se disseminadas mundialmente sendo as carbapenemases do tipo OXA o principal mecanismo associado. (68)

Neste trabalho foram analisados isolados clínicos de ARC constituintes de um estudo de vigilância de resistência aos carbapenêmicos em bacilos gram negativos hospitalares e da comunidade da fronteira oeste do estado do Rio Grande do Sul, que se encontra consideravelmente afastada de grandes centros urbanos e faz divisa com o Uruguai e a Argentina. Inicialmente foram selecionados levando-se em consideração as informações fornecidas pelo laboratório de origem 39 isolados resistentes aos carbapenêmicos pelo teste de disco difusão previamente identificados como *Acinetobacter* sp. Os isolados foram provenientes de uma única instituição de saúde, referência na região e coletados durante um período de aproximadamente cinco anos. Dos *Acinetobacter* spp. analisados, 36 confirmaram a resistência a pelo menos um dos carbapenêmicos testados pela técnica de microdiluição em caldo e destes todos foram positivos para a presença do gene *bla_{OXA-51}*, confirmando a espécie *A. baumannii* e classificados como AbRC.

Os isolados de AbRC foram responsáveis por diversos tipos de infecções atingindo pacientes de todas as faixas etárias e ambos os sexos, majoritariamente associadas às UTIs, sendo as do trato respiratório as mais prevalentes. *A. baumannii* é frequentemente relacionado às infecções do trato respiratório, principalmente às PAVMs em pacientes internados em UTIs. Em um estudo chinês, 35.9% (85/237) dos casos de PAVM analisados em um hospital escola foram causados por *A. baumannii*. (82) Sabe-se também que existe uma relação clonal direta entre cepas presentes no ambiente hospitalar e às infecções por PAVM. (83)

Como já esperado, a totalidade dos isolados de AbRC deste estudo foi também resistente aos demais β -lactâmicos testados (ceftriaxona, ceftazidima e cefepima). Interessantemente, o isolado 1ST, geneticamente não relacionado aos demais, apresentou-se sensível para meropenem e resistente para imipenem com MIC de 1 μ g/mL e 16 μ g/mL respectivamente. Altas taxas de resistência também foram encontradas para ciprofloxacino (100%), gentamicina (86,1%) e amicacina (61,1%). Em contraponto, todos os 36 foram sensíveis a polimixina B.

Os aminoglicosídeos podem ser uma ótima alternativa para tratamento das infecções por *A. baumannii* em isolados que se apresentam sensíveis *in vitro*, entretanto, na prática clínica sua eficácia é maior quando combinadas com outros antimicrobianos, tais como carbapenêmicos ou polimixinas. Contudo, altos níveis de resistência a esta classe têm se tornado cada vez mais prevalente em *A. baumannii* no mundo todo. (79) No Brasil, valores semelhantes de resistência a amicacina e gentamicina foram encontrados em isolados de AbRC relacionados PAVM no estado do Mato Grosso. (51)

As polimixinas foram inicialmente descobertas na década de 1970, porém pouco utilizada na prática clínica devido a seus efeitos colaterais, principalmente nefrotóxicos. Na última década, devido às opções terapêuticas cada vez mais escassas, esta classe voltou a ser utilizada tornando-se uma alternativa valiosa para o tratamento de AbRC. Contudo, em razão do seu uso cada vez mais frequente, isolados de *A. baumannii* com fenótipo de resistência à polimixina passaram a ser relatados mundialmente. (69) Embora os isolados de AbRC deste estudo tenham sido sensíveis à polimixina B, no Brasil já foram reportados casos de *A. baumannii* resistentes às polimixinas, com cepas apresentando valores bem elevados de MIC, atingindo 64 µg/mL. (80) No mundo, a prevalência deste fenótipo tem atingindo níveis cada vez mais alarmantes fazendo do tratamento das infecções um desafio maior ainda. Recentemente, estudos demonstraram sucesso no tratamento de *A. baumannii* resistentes às polimixinas utilizando a combinação de polimixina B, meropenem e ampicilina/sulbactam. (84)

O principal mecanismo associado ao fenótipo de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a produção de OXA-carbapenemases, mais especificamente as do tipo OXA-23. (1, 2, 68) No presente estudo, a OXA-23 foi a mais prevalente, detectada em 94,4% dos isolados. Muito embora os principais subgrupos de OXA-carbapenemase já tenham sido descritos no Brasil, inclusive no estado do Rio Grande do Sul no qual estudos já relataram isolados produtores de outras enzimas como OXA-24/40 e OXA-58, na região estudada a prevalência das enzimas parece estar restrita as do tipo OXA-23. O gene *bla*_{OXA-23} é o mais prevalente relacionado a AbRC em estudos nacionais e internacionais. (1, 2, 6, 11, 10 19, 10, 21, 22, 36, 51, 52, 68)

O gene *bla*_{OXA-51} foi detectado em todos os isolados e foi o único presente em dois dos AbRC analisados, 1ST e 16A. Este gene constitutivo da espécie *A. baumannii* pode estar relacionado ao fenótipo de resistência aos carbapenêmicos dependendo da presença do elemento de inserção *ISAbal1*, que não foi investigado neste estudo. (40) Comumente as enzimas do tipo OXA-51 não possuem poder de hidrólise eficiente (ou tão eficiente) para

conferir resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. No entanto, já foi demonstrado que o elemento IS*Aba1* à montante do *bla*_{OXA-51}, confere resistência aos carbapenêmicos, mesmo na ausência de outra carbapenemase. (39, 40) Além disso, outro gene que pode estar associado ao fenótipo de resistência nestes dois isolados negativos para *bla*_{OXA-23}, poderia ser a presença de *bla*_{OXA-58}, endêmico em isolados de *Acinetobacter* spp. na Argentina, país que faz fronteira a região de origem dos isolados deste estudo e que não foi pesquisado devido à ausência de controle positivo para validação da PCR. (49)

Para a pesquisa das carbapenemases das Classes A e B de Ambler nos isolados deste estudo, foi realizada a triagem fenotípica através do teste de discos de carbapenêmicos combinados com os inibidores clássicos AFB e EDTA, segundo preconizado pela ANVISA e BrCAST. (85, 87) Considerando que este teste é inapto para pesquisa das enzimas da Classe D, a triagem também foi realizada pelo teste de Blue-CARBA (Anexo B) que leva em consideração a atividade da carbapenemase presente e não suas qualidades moleculares. (86)

Todos os isolados foram negativos no teste de associação com os inibidores, evidenciando que as carbapenemases de classe A e B não apresentaram nenhuma contribuição para o fenótipo de resistência observado nos isolados. Portanto, evidenciando um perfil peculiar da região, considerando que em outras regiões do país e, inclusive do estado, as metalo β -lactamases NDM-1 e IMP já foram relatadas em *A. baumannii*. (44, 45, 70) Já o teste de Blue-Carba demonstrou uma especificidade de 100% e sensibilidade de 94,1% para os isolados deste estudo, constituindo uma ferramenta bastante satisfatória para triagem para isolados clínicos do gênero *Acinetobacter* spp. Embora os resultados tenham sido satisfatórios para o teste de Blue-Carba neste estudo, é importante salientar que seu resultado deve ser avaliado com cautela. As OXA-carbapenemases, em geral, são menos eficientes na hidrólise dos carbapenêmicos em detrimento das demais carbapenemases. Assim, a reação causada por estas enzimas no teste de Blue-Carba podem ser por vezes pouco acentuada, ou quase indistinguível. Este fato deve ser levado em consideração na interpretação do teste de Blue-Carba, principalmente na suspeita da produção de OXAs.

Inicialmente, a tipagem dos AbRC deste estudo foi realizada pela técnica de REP-PCR, que tem como principais vantagens o baixo custo, facilidade de execução e não dependência de aparatos específicos em relação à técnica de PFGE. Posteriormente, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), foi possível realizar a tipagem dos isolados pela técnica de PFGE no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto/SP.

A REP-PCR foi padronizada no Laboratório de Pesquisa em Resistência Microbiana (LAPREMIC) da UNIPAMPA, campus Uruguaiana/RS, baseando-se no protocolo de Bou *et al.* (2000). (62) As principais modificações em relação ao protocolo original foram a substituição do brometo de etídio por um reagente comercial (SYBR® Safe, Invitrogen) e o uso de um mix comercial de PCR que precisou ainda ser suplementado com Taq DNA polimerase para o funcionamento da reação.

Através da análise visual dos padrões de bandas, o poder discriminatório da REP-PCR mostrou-se eficiente em comparação ao obtido pela técnica de PFGE. Contudo, a construção do dendrograma revelou divergências entre ambas, principalmente em relação a isolados que não foram relacionados geneticamente entre si na REP-PCR e que foram agrupados com mais de 85% de semelhança a outros isolados pela técnica de PFGE (Anexo C). Ainda, o poder discriminatório relacionado às linhagens clonais foi consideravelmente maior pela técnica de PFGE, contradizendo a conclusão de estudos que obtiveram resultados muito semelhantes na comparação da tipagem de isolados de *A. baumannii* por ambas as técnicas. (60, 62) Esta discordância pode estar relacionada às adaptações realizadas no protocolo da REP-PCR, principalmente em relação ao uso combinado do mix de PCR suplementado com Taq DNA polimerase que podem apresentar variações dependentes de fatores como tempo de estoque ou marca comercial ou a escolha dos métodos estatísticos utilizados para as análises. Todavia, foram considerados os resultados obtidos pela técnica de PFGE na análise oficial da tipagem dos isolados de AbRC deste estudo.

A tipagem revelou a presença e a disseminação de quatro linhagens clonais na instituição, duas delas isoladas durante todo o período do estudo (2014-2018) e duas com origem mais recente, no ano de 2017. Estudos correlacionaram a origem de infecções e surtos por *Acinetobacter* spp. à sua presença no ambiente hospitalar, que pode atuar como reservatório, e sua habilidade de manter-se viável em condições extremas corrobora para sua permanência nas instituições, principalmente em UTIs. (2, 54, 55, 68, 72) Ng *et al.* (2018) analisaram isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de um hospital de Singapura, bem como o ambiente no qual os pacientes infectados estavam internados. Os resultados demonstraram que, entre os pacientes cujas salas foram colonizadas por AbRC, os microrganismos isolados dos pacientes eram clones daqueles presentes no ambiente e concluíram que a contaminação ambiental é comum se os pacientes também forem colonizados ou infectados com AbRC. (71) A prevalência, a permanência e o surgimento de novas linhagem clonais de *A. baumannii* na

população de isolados deste estudo são um importante alerta epidemiológico e salientam a necessidade de medidas de controle mais efetivas.

6 CONCLUSÃO

Como conclusões deste trabalho podemos destacar:

1. Elevada prevalência (92,3%) de isolados do gênero *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos;
2. Prevalência da espécie *A. baumannii* (100%) entre os isolados identificados como *Acinetobacter* spp.;
3. Prevalência de AbRC em infecções do trato respiratório em pacientes de UTIs (76,2%);
4. Altos níveis de resistência aos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos entre os AbRC;
5. Sensibilidade à polimixina B em todos os AbRC;
6. Prevalência do gene *bla_{OXA-23}* (94,4%) nos isolados de AbRC;
7. A prevalência e permanência de duas linhagens clonais (A e A1) durante os quatro anos do estudo e o surgimento de duas linhagens (B e B1) mais recentes.

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo fornecem o primeiro relato da disseminação de AbRC na fronteira oeste do estado do Rio Grande do Sul constatando que esta espécie não está restrita a grandes instituições de saúde e que a resistência aos carbapenêmicos na região estudada está a cima da taxa nacional. Por mais que o perfil de sensibilidade dos isolados de AbRC deste estudo tenha se mostrado bastante restrito, estes ainda se mantêm sensíveis à polimixina B, enfatizando que é de extrema importância que se faça cada vez mais o uso racional e moderado desta classe. A produção de OXA-23 detectada em 94,4% dos isolados estudados foi o mecanismo majoritário e determinante na resistência aos carbapenêmicos. Também foi possível constatar a presença de linhagens clonais de AbRC produtores de OXA-23 prevalentes em todo o período do estudo bem como o surgimento de novas linhagens. A presença da OXA-23 assim como a disseminação e o surgimento de linhagens clonais na instituição aumentam consideravelmente o desafio na terapia das infecções e reforçam a necessidade de medidas de controle mais efetivas. Por fim, os dados deste estudo contribuem para a construção de um panorama nacional mais amplo e geograficamente distribuído da resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos bem como na dinâmica de disseminação desta espécie.

REFERÊNCIAS

- 1 WANG, X.; QIN, L. J. **A review on *Acinetobacter baumannii***. J Acute Dis, 8(1): 16-20. 2019.
- 2 ASIF, M. *et al.* **Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities**. Infection and drug resistance, vol. 11 1249-1260. 2018.
- 3 GERNER-SMIDT, P. *et al.* **Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species**. Journal of clinical microbiology, vol. 29,2: 277-82. 1991.
- 4 NEMEC, A. *et al.* ***Acinetobacter seifertii* sp. nov, a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens**. Int J Syst Bacteriol. 2015.
- 5 COSGAYA, C. *et al.* ***Acinetobacter dijshoorniae* sp. nov., a new member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries**. Int J Syst Evol Microbiol. 2016.
- 6 JUNG, J.; PARK, W. ***Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives**. Appl Microbiol Biotechnol, 99(6):2533–2548. 2015.
- 7 ISLAHI, S. *et al.* **Incidence and risk factors associated with *Acinetobacter* species infection in hospitalized patients in a tertiary care hospital in North-India**. J Comm Dis, 46(3):10–12. 2015.
- 8 SPELLBERG, B.; REX, J. H. **The value of single-pathogen antibacterial agents**. Nat Rev Drug Discov, 12:963. 2013.
- 9 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, 66(8): p. 1839-46. 2011.
- 10 ROCHA, L. *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases**. J Bras Patol Med Lab, v. 53, n. 6, p. 358-361. 2017.
- 11 PILLONETTO, M *et al.* **Molecular investigation of isolates from a multistate polymicrobial outbreak associated with contaminated total parenteral nutrition in Brazil**. BMC infectious diseases, vol. 18,1 397. 2018
- 12 GREENE, C. *et al.* **The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii***. Am J Infect Control, 44(5):e65–e71. 2016.

- 13 DEMIRDAL, T.; SARI, U. S.; NEMLI, S. A. **Is inhaled colistin beneficial in ventilator associated pneumonia or nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*?** *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 15(1):1–6. 2016.
- 14 BASRI, R. *et al.* **Burden of bacterial meningitis: a retrospective review on laboratory parameters and factors associated with death in meningitis, Kelantan Malaysia.** *Nagoya J Med Sci*, 77(1–2):59. 2015.
- 15 LOLANS, K. *et al.* **Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40.** *Antimicrob Agents Chemother*, 50(9):2941. 2006.
- 16 MANIKAL, V. M. *et al.* **Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage.** *Clin Infect Dis*, 31(1):101. 2000.
- 17 NAAS, T. *et al.* **VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France.** *Emerg Infect Dis*, 12(8):1214. 2006.
- 18 COELHO, J. M. *et al.* **Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England.** *J Clin Microbiol*, 44(10):3623. 2006.
- 19 DALLA-COSTA, L. M. *et al.* **Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba.** *Brazil J Clin Microbiol*, 41:3403-6. 2003.
- 20 CARVALHO, K. R. *et al.* **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34:25–8. 2009.
- 21 MARTINS, A. F. *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil.** *Infection*, 37:474-476. 2009.
- 22 FERREIRA, A. E. *et al.* **Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. From hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44:725-730. 2011.
- 23 RARO, O. H. F. *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 50, n. 2, p. 167-172. 2017.
- 24 KEMPF, M.; ROLAIN, J. M. **Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options.** *Int J Antimicrob Agents*, 39 105–114. 2012.
- 25 MATSUI, M. *et al.* **Distribution and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* International Clone II Lineage in Japan.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 62,2 e02190-17. 2018.

- 26 MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N. P. **Multidrug resistant *Acinetobacter***. *J Glob Infect Dis*, 2(3):291–304. 2010.
- 27 VALENCIA, R. *et al.* **Nosocomial outbreak of infection with pan–drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital**. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30(03):257–263. 2009.
- 28 AHMAD, T. A.; TAWFIK, D. M.; SHEWEITA, S. A. **Development of immunization trials against *Acinetobacter baumannii***. *Trials Vaccinol*, 5: 53–60. 2016.
- 29 PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen**. *Clin Microbiol Rev*, 21(3):538–82. 2008.
- 30 BONNIN, R. A.; NORDMANN, P.; POIREL, L. **Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art**. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11 (6):571-583. 2013.
- 31 NING, N. *et al.* **Molecular epidemiology of *bla*_{OXA-23}-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 65-month period in north China**. *BMC infectious diseases*, vol. 17,1 14. 2017.
- 32 HOFFMAN-ROBERTS, H. *et al.* **National Prevalence of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections in the Ambulatory and Acute Care Settings, Including Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* Infections, in the United States in 2015**. *Open Forum Infectious Diseases*, Volume 3, Issue suppl_1, 1488. 2016.
- 33 CAI, B. *et al.* **Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Open forum infectious diseases*, vol. 4,3 ofx176. 2017.
- 34 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**. www.anvisa.gov.br/. 2019.
- 35 ROSSI, F. *et al.* **Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years**. *Braz J Infect, Dis*, 21:98±101. 2017.
- 36 WALSH, T. R. **Emerging carbapenemases: a global perspective**. *Int J Antimicrob Agents*, 36S3: S8-14, 2010.
- 37 AMBLER, R. P. **The structure of beta-lactamases**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289 (1036):321-331. 1980.
- 38 ROBLEDO, I. E. *et al.* **Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico**. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54 (3):1354-1357. 2010.
- 39 EVANS, B. A.; AMYES, S. G. **OXA beta-lactamases**. *Clin Microbiol Rev*, 27 (2):241-263. 2014.

- 40 PAGANO, M.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. **Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii***. Braz. J. Microbiol, v. 47, n. 4, p. 785-792, 2016.
- 41 PEREIRA, P. S. *et al.* **Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340)**. J Antimicrob Chemother, 68:312-6. 2013.
- 42 GISKE C. G. *et al.* **A sensitive and specific phenotypic assay for detection of 51gente- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin**. Clin Microbiol Infect, 17:552-556, 2011.
- 43 ABBOTT, I. *et al.* **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies**. Expert Rev Anti Infect Ther, 11(4):395-409. 2013.
- 44 TOGNIM M. C. *et al.* **Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital**. Infect Control Hosp Epidemiol, 27(7):742-7. 2006.
- 45 PILLONETO, M. *et al.* **First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil**. Antimicrob Agents Chemother, 58(12):7592-4. 2014.
- 46 BUSHNELL, G. *et al.* **Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance**. Int J Infect Dis, 17(5):e325-33. 2013.
- 47 CARVALHO-ASSEF, A. P. *et al.* **Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil**. J Antimicrob Chemother, 68(12):2956-7. 2013.
- 48 POIREL, L.; NORDMANN, P. **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology**. Clin Microbiol Infect, 12 (9):826-836. 2006.
- 49 OPAZO, A. *et al.* **OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America**. J Infect Dev Ctries, 6(4): p. 311-6. 2012.
- 50 FIGUEIREDO, D. Q. *et al.* **First report of the blaOXA-58 gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil**. Mem. Inst. Oswaldo Cru, v. 106, n. 3, p. 368-370. 2011.
- 51 ROYER, S. *et al.* **Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial bla_{OXA-23} producing XDR *Acinetobacter baumannii***. PloS ONE, 13(6):e0198643. 2018.
- 52 da SILVA, K. E. *et al.* **A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit**. PloS ONE, 13(12): e0209367. 2018.

- 53 WERNECK, J. S. *et al.* **OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil:** a case report. *J Antimicrob Chemother*, 66: 452-454. 2010.
- 54 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*, 77(3): p. 250-1. 2013.
- 55 GUSATTI, C. S. *et al.* **First occurrence of *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil.** *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 243-246. 2012.
- 56 HIGGINS, P.G. *et al.* **OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother*, 53(12): p. 5035-8. 2009.
- 57 ANTONIO, C. S. *et al.* **High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*OXA-143 gene in Brazilian hospitals.** *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3): p. 1322-3. 2011.
- 58 KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M.A.; KRISHNAN, P. **Coexistence of *bla*OXA-23 with *bla*NDM-1 and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India.** *J Antimicrob Chemother*, 65(10):2253-4. 2010.
- 59 SABAT, A. J. *et al.* **Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance.** *Euro Surveill*, 18 (4):20380. 2013.
- 60 QUAINOO, S. *et al.* **Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis.** *Clinical Microbiology Reviews*, 30 (4) 1015-1063. 2017.
- 61 SHOJA, S. *et al.* **Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injuries.** *J Chin Med Assoc*, 80(4): 245-252. 2017.
- 62 BOU, G. *et al.* **PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Clin Microbiol Infect*, 6(12):635-43. 2000.
- 63 DEHBALAEI A, *et al.* **Polyclonal Distribution of *bla*OXA-23 Gene Among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Unit Patients in Tehran; Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis,** *Jundishapur J Microbiol*, 11(1):e58032. 2018.
- 64 BARTUAL, S. G. *et al.* **Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (9) 4382-4390; 2005.

- 65 DIACOURT, L. *et al.* **The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool.** PLOS ONE 5(4): e10034. 2010.
- 66 ROCHA, I. V. *et al.* **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones 53gntes53y53 hospital inanimate surfaces.** Brazilian Journal Infection Disease, v.22, n.5, p.438-441. 2018.
- 67 SHAMSIZADEH, Z. *et al.* **Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections.** Environmental health and preventive medicine, vol.22,1 44. 2017.
- 68 WONG, D. *et al.* **Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges.** Clin Microbiol Na 30:409–447. 2017
- 69 CAI, Y. *et al.* **Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 67, Issue 7, Pages 1607–1615. 2012.
- 70 GALES, A. C. *et al.* **Emergence of an IMP-like 53gnt-e-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital.** Diagnostic Microbiology Infectious Disease, 45(1):77-9. 2003.
- 71 Ng D. H. L. *et al.* **Environmental colonization and onward clonal transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in a medical intensive care unit: the case for environmental hygiene.** Antimicrobial Resistance & Infection Control. 7:51. 2018.
- 72 EVEILLARD, M. *et al.* **Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections.** International Journal of Infectious Diseases, 17(10):e802-5. 2013.
- 73 TSAI, H-C. *et al.* **Distribution and Genotyping of Aquatic *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from the Puzi River and Its Tributaries Near Areas of Livestock Farming.** Water, 10(10), 1374. 2018.
- 74 HIGGINS, P. G. *et al.* **OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrobial 53gntes and chemotherapy vol. 57,5, 2121-6. 2013.
- 75 WORKNEH, M.; YEE, R.; SIMNER, P. J. **Phenotypic Methods for Detection of Carbapenemase Production in Carbapenem-Resistant Organisms: What Method Should Your Laboratory Choose?** *Clinical Microbiology Newsletter*, 41(2), 11–22. 2019.
- 76 TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. **Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates.** J Clin Microbiol 56:e01140-18. 2018.

- 77 DEGLMANN, R. C. *et al.* **Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 52, e 0180348. 2019.
- 78 Da SILVA, I. R. *et al.* **Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil.** Microbial Drug Resistance, Apr;25(3):394-399. 2019.
- 79 UPADHYAY S. *et al.* **High-level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from Intensive Care Unit patients in Northeastern India.** Indian J Med Microbiol, 36:43-8. 2018.
- 80 GENTELUCI, G. L. *et al.* **Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 52(2), 91-95. 2016.
- 81 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.** Journal of Clinical Microbiology, 50 (11) 3493-3500. 2012.
- 82 HUANG Y. *et al.* ***Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia: Clinical Efficacy of Combined Antimicrobial Therapy and in vitro Drug Sensitivity Test Results.** Frontiers in Pharmacology, v10, p92. 2019.
- 83 ROYER, S. *et al.* **Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital.** Braz J Infect Dis, vol.19, n.4. 2015.
- 84 JUSTIN, R. L. *et al.* **Polymyxin-resistant, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is eradicated by a triple combination of agents that lack individual activity.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 72, Issue 5, Pages 1415–1420. 2017.
- 85 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica N° 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes.** Pag 1-22. 2013.
- 86 PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. **Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures.** J. Clin. Microbiol. 51:4281–4283. 2013.
- 87 Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos - BrCAST. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica.** Versão 2.0. 2017.



Microbiology Home > Life Sciences > Microbiology

We're working on a new version of this journal site - preview it now

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Brazilian Journal of Microbiology

Editor-in-Chief: Marina **Baquerizo**
ISSN: 1678-4405 (electronic version)
Journal no. 42770



RECOMMEND TO LIBRARIAN

CALL FOR PAPERS ABOUT THIS JOURNAL EDITORIAL BOARD SOCIETY INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Instructions for Authors

TYPES OF ARTICLES

The **Brazilian Journal of Microbiology** accepts submissions of the following article types:

Research Papers:

report results of original research, which has not been published elsewhere.

Short communications:

a short communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.

Reviews:

Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Authors are requested to contact the Editor-in-Chief (bjm.chief@gmail.com) before submission.

Letters to the editor:

letters to the editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.

Your manuscript must be written clearly, in comprehensible, and linguistically correct English. Manuscripts written in poor English will not be accepted. Please check the section "English Language Support" how to get assistance.

Sections

The **Brazilian Journal of Microbiology** has the following sections (one them should be selected during the electronic submission process):

- # Biotechnology and Industrial Microbiology
Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria. Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi. Molecular aspects of fungal biotechnology. Molecular aspects of bacterial biotechnology.
- # Food Microbiology
Applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production. Food borne diseases, food spoilage, and microbial ecology in foods.
- # Bacterial and Fungal Pathogenesis
The genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis.
- # Clinical Microbiology
Studies of medically-important bacteria, fungi and virus.
- # Environmental Microbiology
Ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms. Microbial interactions. Biodegradation, Bioremediation, and Environmental considerations for genetically engineered microorganisms.
- # Veterinary Microbiology
Diseases of animals; Control and/or treatment of animals, Animal pathogen diagnostics, and Veterinary or zoonotic pathogens
- # Fungal and Bacterial Physiology
Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process.
- # Bacterial, Fungal and Virus Molecular Biology
Fungal and bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics.
- # Education in Microbiology
Original research papers and reviews covering education and learning technologies in Microbiology. Reporting experiences of learning methods with undergraduate or graduate students; effectiveness of pedagogical approaches; development and assessment of trends in education in microbiology.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Plagiarism prevention with CrossCheck

Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database. This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed Data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

EDITORIAL PROCEDURE

Single-blind peer review

This journal follows a single-blind reviewing procedure.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or Math Type for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- # Journal article
 - Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
- Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329
- # Article by DOI
 - Sifka MK, Whittion JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- # Book
 - South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
- # Book chapter
 - Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- # Online document
 - Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- # Dissertation
 - Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org/LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 KB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

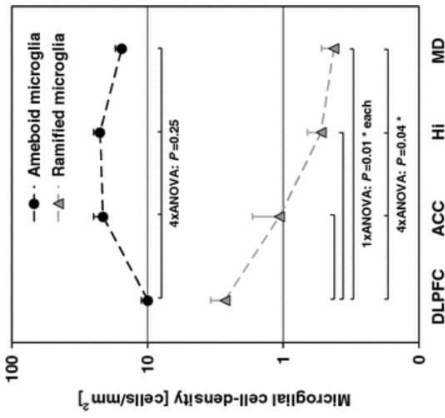
- # All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- # Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- # For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- # Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- # Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- # Supply all figures electronically.
- # Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- # For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- # Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- # Definition: Black and white graphic with no shading.
- # Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- # All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- # Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

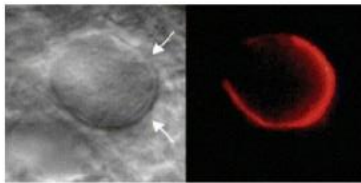


Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

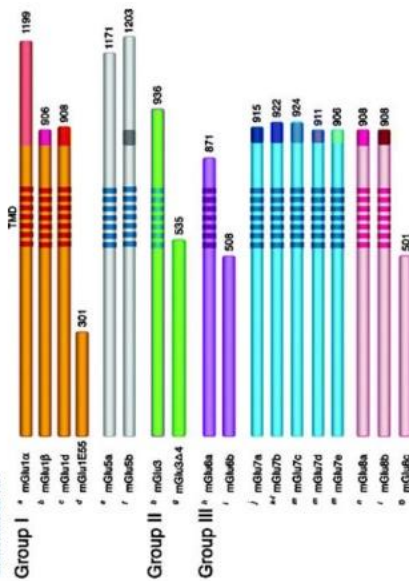
Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3
Maximum file size: 25 GB
Minimum video duration: 1 sec
Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wr (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)". ... additional data are given in Online Resource 4".
Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [View the full list](#)

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

* Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

RESEARCH DATA POLICY

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper.

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory:

Mandatory deposition	Suitable repositories
Protein sequences	UniProt GenBank
DNA and RNA sequences	DNA DataBank of Japan (DDBJ) EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA)
DNA and RNA sequencing data	NCBI Trace Archive (SRA) NCBI Sequence Read Archive (SRA)
Genetic polymorphisms	dbSNP dbVar European Variation Archive (EVA)
Linked genotype and phenotype data	dbGAP The European Genome-phenome Archive (EGA)
Macromolecular structure	Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) Electron Microscopy Data Bank (EMDB)
Microarray data (must be MIAME compliant)	Gene Expression Omnibus (GEO) Array-express
Crystallographic data for small molecules	Cambridge Structural Database

For more information:

Research Data Policy Frequently Asked Questions

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate. Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- 1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- 2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- 3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- 4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- 5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

Data availability statements

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').

- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own (plagiarism). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/web surveys and scales in their studies (if appropriate). Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person. Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

- *All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send it requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs

- ii- Employment or consultation
- ii- Support from a project sponsor
- ii- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- ii- Multiple affiliations
- ii- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- ii- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- ii- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the name of the ethics committee that granted the exemption and the reasons for the exemption).

Authors must - in all situations as described above - include the name of the ethics committee and the reference number where appropriate.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee (include name of committee + reference number) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

Ethical approval retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). Please provide the name of ethics committee and relevant permit number.

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted (include name of committee + permit number)"

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

"This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

"Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

AUTHORSHIP PRINCIPLES

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at al., PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the

Editor:

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

• Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

• Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name], ...; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name], ...;

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author.

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of

the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or

Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

ENGLISH LANGUAGE SUPPORT

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below

[English language tutorial](#)
[Nature Research Editing Service](#)
[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

[READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK](#)

All Volumes & Issues

Vol. 31–49

FOR AUTHORS AND EDITORS

2018 Impact Factor

2.857

Aims and Scope

Submit online

Instructions for Authors

SERVICES FOR THE JOURNAL

Contacts

Download Product Flyer

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in [Brazilian Journal of Microbiology](#).

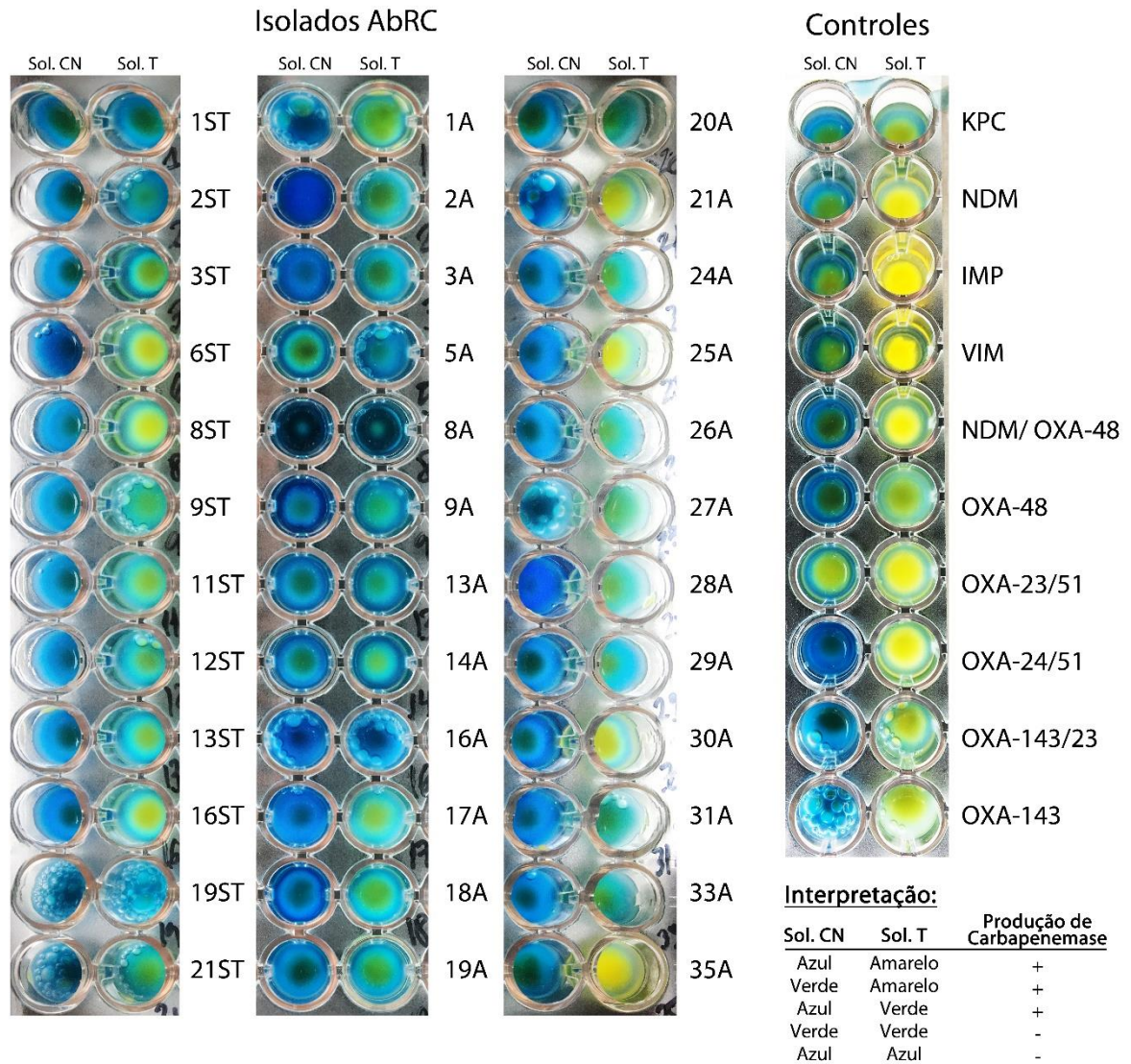
LOGIN

Please send me information on new Springer publications in Microbiology.



The change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Anexo B – Teste de Blue-Carba para detecção fenotípica de carbapenemases



Resultado:

32 isolados positivos.

Sensibilidade: 94,1%

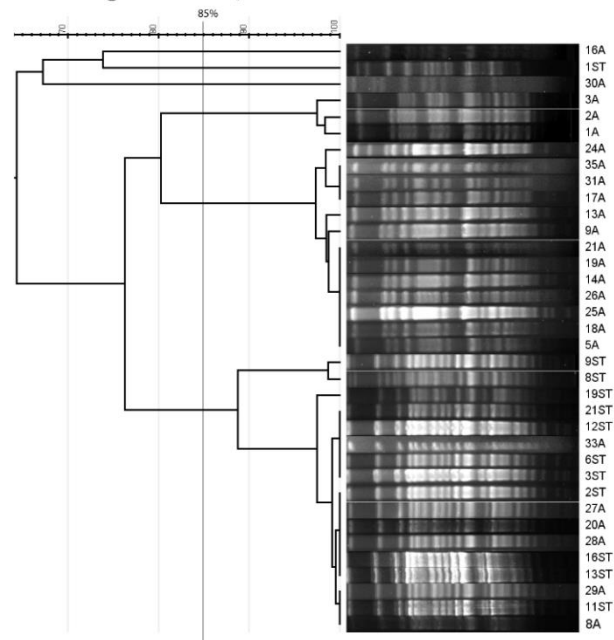
Especificidade: 100%

Legenda: Sol. CN= Solução controle negativo; Sol. T= Solução Teste; AbRC= *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

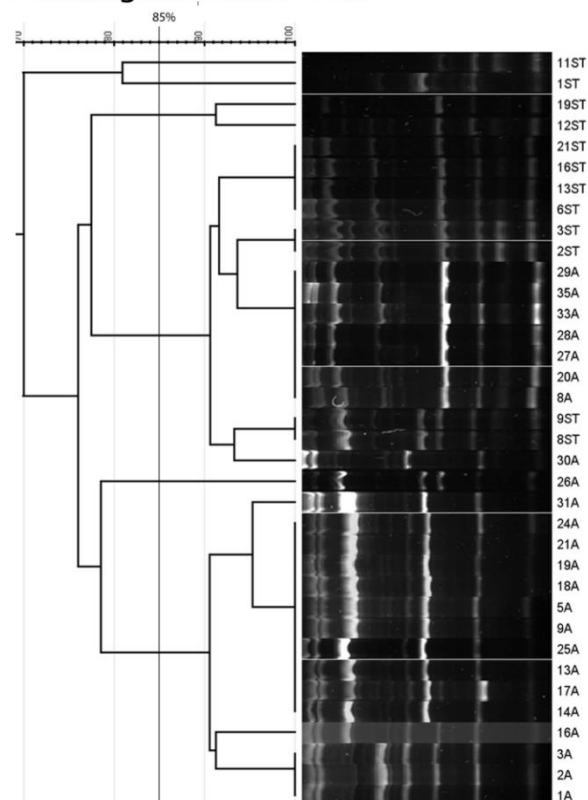
Fonte: Pires *et al.*, 2013. (86)

Anexo C – Dendrogramas obtidos técnicas de PFGE e REP-PCR para os isolados de AbRC

Dendrograma A. *ApaI*-PFGE



Dendrograma B. REP-PCR



Legenda: Dendrograma A= Tipagem por *ApaI*-PFGE realizada o LEBEM segundo protocolo do CDC, EUA. Dendrograma B= Tipagem por REP-PCR, baseada no protocolo de BOU *et al.* (2000). (62) O coeficiente de similaridade foi calculado a partir do método de Dice e o agrupamento pelo método de UPGMA para análise de ambas as técnicas.