UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados a *Acinetobacter* spp. multidroga resistente isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.

Stella Buchhorn de Freitas

Pelotas, 2018

Stella Buchhorn de Freitas

Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados a *Acinetobacter* spp. multidroga resistente isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F863e Freitas, Stella Buchhorn de

Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados a Acinetobacter spp. multidroga resistente isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil / Stella Buchhorn de Freitas ; Daiane Drawanz Hartwig, orientadora. — Pelotas, 2018.

46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Complexo ACB. 2. A. baumannii. 3. Carbapenemases. 4. Pfge. I. Hartwig, Daiane Drawanz, orient. II. Título.

CDD : 614.4

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Stella Buchhorn de Freitas

Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados a *Acinetobacter* spp. multidroga resistente isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de novembro de 2018

Banca examinadora:

Profª. Drª. Daiane Drawanz Hartwig (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Drª. Thaís Larré Oliveira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Clóvis Moreira Junior
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Msc. Marcos Roberto Alves Ferreira
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais, Ronaldo e Romilda, pelo amor incondicional e incentivo constante.

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, por todas as minhas conquistas alcançadas e por me conceder saúde, sabedoria e serenidade para batalhar pelos meus sonhos.

Aos meus pais, Ronaldo Freitas e Romilda Freitas, pelo amor incondicional, dedicação e confiança depositados em mim. E às minhas irmãs, Natália Freitas e Júlia Freitas, pelo companheirismo, amizade e conforto nas horas difíceis. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Dionatan Araújo, por todo amor, carinho, incentivo e por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma acreditei.

À minha orientadora Daiane Drawanz Hartwig, por toda confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e incentivos para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus eternos colegas do Laboratório 10, Henrique Queiroz, Caroline Lopes, Bárbara Roloff, Francine Sinnott, Thaís Collares e Leornardo Monte, por todos os ensinamentos, auxílio e amizade durante todo meu período de graduação.

Ao Marcos Ferreira, por toda paciência, suporte e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do LBMM por todo auxílio e companheirismo. Vocês foram fundamentais para realização do trabalho.

Aos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse esta etapa com êxito e satisfação.

Muito obrigada!

Resumo

FREITAS, Stella Buchhorn de. **Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados a *Acinetobacter* spp. multidroga resistente isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.** 2018. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2018.

Com exceção da espécie ambiental *Acinetobacter calcoaceticus*, todas as espécies do complexo ACB (*Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*) tem sido comumente associadas com surtos de infecções em ambientes hospitalares afetando, principalmente, indivíduos imunocomprometidos. Em função da gravidade das manifestações clínicas e da alta capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, *A. baumannii* é considerada a espécie de maior relevância clínica e epidemiológica. O aparecimento de isolados *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos tem resultado em diversos problemas de saúde pública, uma vez que limitam as opções de tratamento para essas infecções. Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar as espécies, estabelecer o perfil genético e avaliar a resistência e síntese de carbapenemases em isolados ACB, coletados entre outubro de 2014 e julho de 2016, em um hospital localizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Para tal, vinte e dois isolados ACB foram submetidos a PCR multiplex de *gyrB* e bla_{OXA-51} para identificação molecular a nível de espécie. A relação genética foi estabelecida através da técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e os perfis de resistência aos antimicrobianos foram avaliados através da técnica de Disco-Difusão em Ágar. Os isolados resistentes a classe dos carbapenêmicos foram avaliados quanto à produção de carbapenemases através do Teste de Hodge Modificado (THM) e PCR para os genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58}, bla_{VIM} e para a sequência de inserção IS*Aba*1. Todos os isolados avaliados neste estudo foram caracterizados como da espécie *A. baumannii*, sendo pertencentes a quatorze perfis genéticos distintos. Todos os isolados foram caracterizados como multidroga-resistentes (MDR), sendo 100% dos isolados resistentes a todas as cefalosporinas testadas, 95.4% resistentes ao meropenem e 77.3% resistentes ao imipenem. O THM revelou 95.4% dos isolados como produtores de carbapenemases e o gene bla_{VIM} foi identificado em 90.9% dos isolados. Este estudo demonstrou elevada ocorrência de *A. baumannii* MDR em ambiente hospitalar. Isolados coletados no período de dois anos demonstraram relação genética, assim como o mesmo clone foi identificado em setores distintos do hospital, evidenciando a capacidade de disseminação e persistência no ambiente. Além disso, esses patógenos demonstraram resistência a carbapenêmicos, sendo a síntese de carbapenemases um importante mecanismo de resistência associado a esses isolados. A correta identificação desses microrganismos e os estudos acerca dos mecanismos de resistência são de extrema importância para o planejamento de medidas de controle, prevenção e abordagens terapêuticas. Além disso, análises dos perfis genéticos, dos potenciais de disseminação e capacidade de persistência ambiental desses microrganismos tornam-se interessantes alvos de estudo na tentativa de prevenir o aparecimento de novas infecções.

Palavras-chave: Complexo ACB; *A. baumannii*; carbapenemases; PFGE.

Abstract

FREITAS, Stella Buchhorn de. **Molecular epidemiology and resistance mechanisms associated with *Acinetobacter* spp. multidrug-resistant isolated in hospital in Pelotas, RS, Brazil**. 2018. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2018.

With the exception of the environmental species *Acinetobacter calcoaceticus*, all species of the ACB complex (*Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii*) have being commonly associated with outbreaks of infections in hospital settings and mainly affect immunocompromised individuals. Due to the severity of clinical manifestations and the high capacity to develop antimicrobial resistance mechanisms, *A. baumannii* has being considerate the most important clinical and epidemiological species. The increased incidence of carbapenem-resistant strains of *A. baumannii* has resulted in a number of public health problems, since they limit treatment options for these infections. The objective of this study was to identify the species, to establish the genetic profile and to evaluate the resistance and synthesis of carbapenemases in ACB isolates, collected between October 2014 and July 2016, in a hospital located in the city of Pelotas, RS, Brazil. For this, twenty-two ACB isolates were submitting to multiplex PCR of *gyrB* and bla_{OXA-51} for molecular identification at the species level. The genetic relationship was establishing through the *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) technique and the profiles of antibacterial resistance were evaluated through the Agar-Diffusion technique. Carbapenem-resistant isolates were evaluating about the production of carbapenemases through the Modified Hodge Test (THM) and PCR for the genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58} bla_{VIM} and the IS*Aba*1 insertion sequence. All the isolates evaluated in this study were characterizing as *A. baumannii* species, belonging to fourteen different genetic profiles. All isolates were characterizing as multidrug-resistant (MDR) and the highest resistance profiles were observed in the class of cephalosporins, where 100% of the isolates showed resistance to all antibacterials belonging to this class. 95.4% of the isolates were classifying as resistant to meropenem, while 77.3% were resistant to imipenem. The THM revealed 95.4% of the isolates as producers of carbapenemases and the bla_{VIM} gene was identified in 90.9% of the isolates. This study demonstrated a considerable occurrence of *A. baumannii* MDR in a hospital environment. Isolates collected over a period of two years showed a genetic relationship, just as the same clone was identified in different sectors of the hospital, evidencing the capacity of dissemination and persistence in the environment. In addition, these pathogens demonstrated resistance to carbapenems and the synthesis of carbapenemases is an important mechanism of resistance associated with these isolates.The correct identification of these microorganisms and the studies about resistance mechanisms are extremely important for the planning of control measures, prevention and therapeutic approaches. In addition, analyzes of the genetic profiles, dissemination potentials and ability of environmental persistence of these microorganisms become interesting targets of study in the attempt to prevent the appearance of new infections.

Keywords: ACB Complex; *A. baumannii*; carbapenemases; PFGE.

Lista de abreviaturas

ACB – Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*

CRAb – Carbapenem resistant A. baumannii (*A. baumannii* resistente à carbapenêmicos)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

ESBL – *Extended-spectrum beta-lactamases* (Beta-lactamases de espectro estendido)

GS1 – *genospecies 1*

GS2 – *genospecies 2*

GS3 – *genospecies 3*

GS13TU – *genospecies 13TU*

gyrB – subunidade β da DNA-girase

IS*Aba* – Sequência de Inserção de *A. baumannii*

LPS – Lipopolissacarídeo

MBL – Metalo-β-lactamases

MDR – *Multidrug resistant* (Multidroga-resistente)

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima)

OMP – *Outer Membrane Proteins* (Proteínas de Membrana Externa)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OMV – *Outer Membrane Vesicles* (Vesículas de Membrana Externa)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Campo Pulsado)

RNA- *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

rRNA- RNA ribossomal

rpoB – subunidade β da RNA polimerase

tRNA- RNA transportador

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Sumário

1 Introdução 10

2 Revisão da Literatura 12

2.1 *Acinetobacter* spp. 12

2.2 *Acinetobacter baumannii* 14

2.3 Mecanismos de virulência e patogenicidade em *Acinetobacter baumannii* 15

2.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii* 16

2.5 *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb) 18

2.6 Aspectos epidemiológicos de *Acinetobacter baumannii* 19

3 Hipóteses e Objetivos 22

3.1 Hipóteses 22

3.2 Objetivo geral 22

3.3 Objetivos específicos 22

4 Capítulos 23

4.1 Manuscrito 23

5 Conclusões gerais 42

Referências 43

1 Introdução

O gênero *Acinetobacter* spp. é composto por um grupo de microrganismos Gram-negativos naturalmente encontrados no trato gastrointestinal e pele de humanos saudáveis, animais, vegetais, solo e água (MARTINS & BARTH, 2013). Esse grupo é representado por mais de 50 espécies identificadas, sendo que algumas delas apresentam importância clínica em função de estarem associadas a ocorrência de surtos de infecções hospitalares (HARDING, HENNON & FELDMAN, 2017). As espécies *A. nosocomialis, A. pittii*, *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* estão intimamente relacionadas em aspectos genéticos e fenotípicos e, portanto, são agrupadas no chamado complexo ACB (Complexo *A. calcoaceticus - A. baumannii*) (HIGGINS et al., 2010).

Devido a íntima relação genética, a correta identificação das espécies pertencentes ao complexo ACB é de extrema importância, uma vez que os mecanismos de invasão e virulência, resistência aos antimicrobianos e as manifestações clínicas e epidemiológicas são distintas entre as espécies (HIGGINS et al., 2010; WANG et al., 2014; LEE et al., 2017). Entretanto, a identificação dessas espécies através de análises de rotina laboratorial, como aplicação de testes bioquímicos e ensaios fenotípicos, é extremamente difícil, laboriosa e apresenta baixo sucesso na diferenciação desses microrganismos (LEE et al., 2013). Recentemente, a aplicação de novas técnicas para avaliar parâmetros moleculares espécie-específicos tem obtido grande sucesso na identificação das espécies desse complexo. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex para subunidade β da DNA girase (gene *gyrB*) tem demonstrado um grande potencial de diferenciação entre espécies altamente relacionadas em função da elevada heterogeneidade dessa região (HIGGINS et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2016).

Acinetobacter baumannii é considerada a espécie mais relevante em aspectos clínicos e epidemiológicos, principalmente em decorrência de seus mecanismos inatos e adquiridos de resistência a um amplo espectro de drogas antimicrobianas e sua tendência de ocasionar surtos epidêmicos (HIGGINS et al., 2007; WANG et al., 2014; RODRÍGUEZ, NASTRO & FAMIGLIETTI, 2018). Infecções causadas por esse patógeno geralmente estão associadas com quadros de pneumonias, septicemias, meningites e infecções urinárias e afetam, principalmente, indivíduos imunocomprometidos alocados em ambientes hospitalares (MARTINS & BARTH, 2013; LI et al., 2016; HARDING et al., 2017). Isolados *A. baumannii* são amplamente distribuídos em ambiente hospitalar, cuja

disseminação pode ocorrer entre pacientes e através da contaminação de equipamentos e materiais (BIALVAEI et al., 2017).

A larga administração de antibióticos para o tratamento de infecções, associada a capacidade desses microrganismos em adquirir mecanismos de resistência, tem resultado no aparecimento de isolados *A. baumannii* altamente resistentes às diversas classes de antimicrobianos disponíveis para uso em humanos, incluindo os carbapenêmicos. Até o momento, os antibióticos da classe dos carbapenêmicos tem sido considerados agentes de escolha para tratamento de infecções por *A. baumannii* multidroga-resistentes (MDR) (TURTON et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2018). Contudo, com o aparecimento de isolados *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (CRAb), as aplicações terapêuticas tornam-se mais limitadas, acarretando em um enorme problema de saúde pública (WANG et al., 2014).

O principal mecanismo de resistência associados aos carbapenêmicos é a síntese de carbapenemeases. Em *A. baumannii*, as β-lactamases de classe B (metalo-β-lactamases) e D (oxacilinases) são as enzimas mais comumente relatadas e geralmente estão associadas com essas características (RODRÍGUEZ et al., 2018). Além disso, elementos de transposição genética, como as sequências de inserção em *A. baumannii* (IS*Aba*), também tem sido relacionadas com o aumento da resistência a diversos antibacterianos (SEGAL et al., 2005).

A técnica de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), assim como outras metodologias, são de grande importância em análises de comportamentos epidemiológicos desses microrganismos (VIEIRA & PICOLI, 2015). Essas metodologias fornecem informações acerca do perfis genéticos, de forma a ser possível estabelecer padrões moleculares associados com a ocorrência de surtos epidêmicos. Como resultado, essas metodologias colaboram para um melhor planejamento de medidas de controle efetivas e ações terapêuticas para evitar os processos de aquisição de mecanismos de resistência, disseminação ambiental e infecções por esses patógenos.

Sendo assim, neste trabalho, buscamos identificar, a nível de espécie, vinte e dois isolados ACB multidroga-resistentes obtidos de um hospital localizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Além disso, objetivamos elucidar os mecanismos envolvidos no processo de resistência aos carbapenêmicos e estabelecer o perfil genético dos isolados através da técnica de PFGE.

2 Revisão da Literatura

2.1 *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende um grupo de microrganismos Gram-negativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, não móveis e não fermentadores do tipo cocobacilos, pertencentes a família *Moraxellaceae* e ordem *Gammaproteobacteria* (PELEG, SEIFERT & PATERSON, 2008; MARTINS & BARTH, 2013). Bactérias pertencentes a esse gênero são consideradas não-fastidiosas e apresentam colônias de formas e tamanhos variados, sendo comumente visualizadas com aspecto liso e mucoide cuja coloração varia conforme o meio de cultura utilizado (ALMASAUDI, 2018). *Acinetobacter* spp. é constituído por mais de 50 espécies, sendo que a grande maioria são consideradas espécies não-patogênicas. Um número reduzido de espécies são de grande importância clínica, sendo caracterizadas como patógenos oportunistas em humanos (HARDING, HENNON & FELDMAN, 2017). Esses microrganismos são encontrados no trato gastrointestinal e pele de humanos saudáveis, animais, vegetais, solo e água. Além disso, é descrita a identificação de algumas espécies colonizando objetos inanimados em ambientes hospitalares, como cateteres, leitos, bancadas, sistemas de circulação de ar, dentre outros (MARTINS & BARTH, 2013).

Devido a semelhanças fenotípicas e a estreita relação genética entre espécies, *A. baumannii* (GS2), juntamente com *A. nosocomialis* (GS13TU), *A. pittii* (GS3) e *A. calcoaceticus* (GS1) são agrupadas no chamado complexo *A. calcoaceticus – A. baumannii* (complexo ACB) (CARVALHO, 2013). Com exceção de *A. calcoaceticus*, que é uma espécie ambiental e não está relacionada com patologias humanas graves, todas as espécies do complexo ACB são de importância clínica (HIGGINS et al., 2010; CHEN et al., 2014; HARDING, HENNON & FELDMAN, 2017). Apesar das semelhanças entre esses microrganismos, a correta identificação é de fundamental importância, uma vez que existem consideráveis diferenças entre as espécies nos aspectos clínicos, epidemiológicos, perfis de sensibilidade aos antibacterianos e mecanismos de virulência e patogenicidade (HIGGINS et al., 2010; LEE et al., 2017).

Em ambientes hospitalares, a identificação de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. auxilia no entendimento de parâmetros de incidência e virulência desses patógenos. Contudo, as espécies pertencentes ao complexo ACB são de difícil identificação através de ensaios bioquímicos, usualmente aplicados para análises em laboratórios

hospitalares (LI et al., 2016). O teste de Bouvet e Grimont, desenvolvido em 1986 e reajustado em 1987, é um exemplo de ensaio para identificação de espécies de *Acinetobacter* spp. através de parâmetros microbiológicos. Esse ensaio consiste em uma análise fenotípica com 28 testes, incluindo temperaturas ideais de crescimento e assimilação de diferentes fontes de carbono. Embora tenha sido amplamente utilizado para distinguir as espécies descritas na década de 90, atualmente sabe-se que este teste não é o mais adequado para diferenciar as espécies mais recentemente descritas, bem como as espécies clinicamente relevantes *A. baumannii e A. nosocomialis* (PELEG et al., 2008). O sistema VITEK 2, juntamente com outros equipamentos semiautomatizados de uso comercial, como API 20NE, Phoenix e MicroScan WalkAway, tem sido utilizado como rotina laboratorial em diversos centros hospitalares para identificação de microrganismos. Contudo, esses sistemas são propensos a ter suas análises alteradas em função das condições de cultivo e identifica erroneamente cerca de 25% dos isolados pertencentes as espécies do complexo ACB como sendo *A. baumannii* (HIGGINS et al., 2007, 2010; WANG et al., 2014).

Com o avanço de estudos de biologia molecular, diversos ensaios tem sido propostos como alternativa para identificação de espécies *Acinetobacter* em razão da proximidade genética entre as espécies desse gênero. Análises de fragmentos de restrição de rRNA, hibridização DNA-DNA e tRNA *fingerprinting* podem ser aplicados com essa finalidade (EHRENSTEIN et al., 1996) Contudo, demandam muito tempo, são laboriosos e de difícil interpretação, tornando-se restritos a alguns laboratórios de referência. Além disso, análises utilizando a técnica de tRNA *fingerprinting* não têm capacidade de distinção entre as espécies *A. baumannii* e *A. nosocomialis* (HIGGINS et al., 2007, 2010).

Dentre as mais recentes técnicas moleculares aplicadas, o sequenciamento da região espaçadora 16s-23s rRNA e do gene *rpoB* tem mostrado uma elevada capacidade de distinguir espécies do complexo ACB (HIGGINS et al., 2007; PELEG et al., 2008; WANG et al., 2014). Além disso, a utilização de equipamentos para análise de espectrometria de massas, como o MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight)* tem auxiliado na identificação de componentes moleculares específicos da membrana externa de cada componente do complexo ACB, tornando a identificação das espécies mais precisa e confiável (HARDING et al., 2017). Entretanto, essas análises tem custo elevado, são laboriosas e dispendem de um longo período de

tempo para a execução, o que limita as suas aplicações em laboratórios de rotina (PELEG et al., 2008).

A técnica de PCR para amplificação de fragmentos do gene *gyrB,* responsável por codificar a subunidade β da DNA girase, tem demonstrado um elevado potencial para identificar espécies altamente relacionadas. Em função da alta heterogeneidade dessa região, cada espécie pode ser identificada através da observação dos diferentes tamanhos de fragmentos gerados, tornando o teste altamente sensível e de fácil implementação (TEIXEIRA et al., 2016). A aplicação da técnica de PCR multiplex para essas regiões espécie-específicas já foi descrita como um método rápido, simples e altamente específico, com elevada capacidade de diferenciação das espécies do complexo ACB (HIGGINS et al., 2010).

2.2 *Acinetobacter baumannii*

Dentre os microrganismos pertencentes ao complexo ACB, *A. baumannii* é a espécie melhor caracterizada, além de ser considerada a mais importante em aspectos clínicos. Patógenos dessa espécie se destacam das demais por apresentarem resistência a um espectro maior de antibacterianos, estarem relacionados a quadros clínicos relativamente mais graves e responderem de forma distinta à terapia apropriada (MARTINS & BARTH, 2013; CHEN et al., 2014). A espécie *A. baumannii* tem sido relacionada com 80% dos isolados causadores de doenças em humanos e é responsável por 2-10% de todas as infecções causadas por patógenos Gram-negativos em UTIs na Europa e Estados Unidos (BIALVAEI et al., 2017). Estudos apontam que as infecções por esse patógeno atribuem um índice de mortalidade de 7,8-23% em pacientes hospitalizados e 10-43% em pacientes internados em UTIs. Além disso, essas infecções prolongam o tempo de permanência hospitalar dos pacientes de forma bastante significativa (VIEIRA & PICOLI, 2015).

A organização mundial da saúde (OMS) inclui *A. baumannii* como um dos microrganismos pertencentes ao grupo "*ESKAPE*" (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, A. baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) que são assim denominados por apresentarem mecanismos de "escapar" dos efeitos das drogas antimicrobianas (LEE et al., 2017). Quando comparada a outros patógenos Gram-negativos, *A. baumannii* possui uma baixa incidência global; entretanto, a preocupação acerca dessas infecções se relaciona com

a capacidade de aquisição de mecanismos de resistência desses microrganismos a um amplo espectro de agentes antimicrobianos, originando cepas altamente resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Em âmbitos globais, cerca de 45% de todos os isolados de *A. baumannii* são considerados MDR, sendo que a América Latina e Oriente Médio tem até 70% dos isolados relatados com ampla resistência aos antimicrobianos conhecidos (HARDING et al., 2017).

A. baumannii é frequentemente identificada como agente causador de infecções em ambientes hospitalares que geralmente estão associadas à quadros de pneumonias, septicemias, meningites e infecções urinárias. Esse patógeno acomete, especialmente, pacientes imunocomprometidos em decorrência de procedimentos invasivos, pacientes transplantados, em fase de utilização de antineoplásicos ou indivíduos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, diversos quadros de osteomielite e infecção de sítio cirúrgico foram descritos em pacientes poli traumatizados, como relatado em soldados repatriados da Guerra do Iraque (MARTINS & BARTH, 2013; VIEIRA & PICOLI, 2015). Por se tratar de um patógeno oportunista, infecções comunitárias são raramente relatadas e, quando mencionadas, estão associadas a comorbidades como alcoolismo, tabagismo, diabetes mellitus e doença pulmonar obstrutiva crônica (MARTINS & BARTH, 2013; LI et al., 2016; HARDING et al., 2017). *A. baumannii* tem sido frequentemente isolada em equipamentos médico-hospitalares de uso comunitário, como tubos de ventilação, aparatos para monitoramento de pressão arterial, umidificadores e lavatórios. Além disso, esses patógenos tem sido isolados, também, da pele de profissionais de saúde, bem como de colchões e travesseiros utilizados em leitos hospitalares (ALMASAUDI, 2018).

2.3 Mecanismos de virulência e patogenicidade em *Acinetobacter baumannii*

Diversos fatores relacionados com a virulência e patogenicidade em *A. baumannii* já foram identificados, sugerindo uma importante influência nos mecanismos de infecção e colonização por esse patógeno (MARTINS & BARTH, 2013). Estudos recentes têm focado na análise de parâmetros moleculares, clínicos e fisiopatológicos com o objetivo de elucidar os mecanismos que levam a emergência de *A. baumannii* como patógeno de elevada prevalência em ambientes hospitalares. Isolados clínicos de *A. baumannii* apresentam elevada capacidade de persistir e resistir sob condições ambientais desfavoráveis a grande maioria dos patógenos bacterianos e demonstram ampla

resistência aos processos de dessecação, mantendo-se viáveis por longos períodos sobre superfícies secas (MARTINS & BARTH, 2013; HARDING et al., 2017). Essa resistência é variável conforme os isolados clínicos, sendo que há registros de isolados que conseguem manter a viabilidade por até 100 dias sob condições de restrição de água. Essa característica é resultante de diversos fatores e ainda não é claramente definida, embora estudos recentes sugiram a presença de polissacarídeos capsulares que induzem capacidade de retenção de água além de proteger a célula contra ameaças externas (HARDING et al., 2017). Além disso, a elevada capacidade de formação de biofilmes é um fator que favorece a colonização bacteriana em superfícies de equipamentos hospitalares, induzindo durabilidade a longo prazo e dificuldade de sua completa eliminação do local (BABAPOUR et al., 2016).

Um elevado número de fatores de virulência são definidos como determinantes para a patogenicidade de *A. baumannii*, sendo os mesmos associados com os processos de adesão, invasão e persistência do patógeno no hospedeiro. Contudo, embora essa espécie acumule diversas estratégias para o estabelecimento do processo infeccioso, a variedade desses fatores é baixa quando comparada a outros patógenos Gram-negativos. Dentre os mecanismos melhores elucidados, destacam-se a presença de porinas, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos (LPS), fosfolipases, vesículas de membrana externa (*Outer membrane vesicles* – OMV), sistemas de aquisição de metais, sistemas de secreção de proteínas e proteínas de ligação a penicilina (LEE et al., 2017). Além disso, esses patógenos apresentam elevada capacidade de aquisição de nutrientes essenciais como o ferro, secreção de moléculas tóxicas (enzimas) que levam a danos teciduais nos locais de infecção e mecanismos de adesão às células epiteliais com consequente indução do processo apoptótico (MARTINS & BARTH, 2013).

2.4 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii*

Uma das grandes preocupações acerca do aumento da incidência de infecções por *A. baumannii* é o fato dessa espécie estar relacionada com quadros de resistência a múltiplos antimicrobianos disponíveis para uso em humanos (TURTON et al., 2006). Esses patógenos apresentam mecanismos intrínsecos de resistência a uma ampla variedade de antibacterianos e respondem rapidamente a pressão seletiva do meio ambiente (CARVALHO, 2013). Segundo a definição, isolados MDR são aqueles que

apresentam resistência a duas ou mais das seguintes classes de antibióticos: a) cefalosporinas (ceftazidima ou cefepime); b) carbapenêmicos (imipenem ou meropenem); c) ampicilina/sulbactam; d) fluoroquinolonas (ciprofloxacina ou levofloxacina); e) aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina ou tobramicina) (SINGH, THANGARAJ & CHAKRABARTI, 2013).

Estudos recentes apontam que essa espécie tem uma elevada habilidade de agregar sequências de DNA externo ao seu conteúdo genético. *A. baumannii* apresenta uma alta frequência de DNA exógeno compondo seu genoma, evidenciando a frequente transferência genética horizontal entre microrganismos (LEE et al., 2017). Elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons são os principais meios de disseminação e aquisição de fatores de resistência associados com estes patógenos (BIALVAEI et al., 2017).

Sequências de inserção em *A. baumannii* (IS*Aba*) também tem sido relatadas como fatores que favorecem a diminuição da sensibilidade aos antibacterianos e são facilmente disseminadas entre os microrganismos. Essas sequências são os menores e mais abundantes elementos de transposição independente e podem resultar em mutações e rearranjos do genoma (CARVALHO, 2013). Sequências de inserção podem conter regiões promotoras que, se localizadas na porção 5’ do cassete gênico, podem aumentar a expressão de enzimas relacionadas com a degradação de antibacterianos (SEGAL et al., 2005).

A resistência em *A. baumannii* está relacionada com uma série de mecanismos moleculares, dentre os quais destacam-se a síntese de enzimas β-lactamases, presença de bombas de efluxo, modificações nos sítios de ligação aos antibióticos, defeitos na permeabilidade celular e enzimas de modificação de aminoglicosídeos. Destes, a síntese de β-lactamases é o maior responsável pela resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos (LEE et al., 2017).

Os antibióticos β-lactâmicos são uma opção terapêutica importante para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, em função de sua eficácia e potencial de intensificar seus efeitos através de modificações químicas. Contudo, a aquisição de mecanismos de resistência, principalmente através da síntese de β-lactamases, tem limitado a utilização desses fármacos para o tratamento de infecções (VIEIRA & PICOLI, 2015). Em função das semelhanças nas estruturas moleculares dessas enzimas, Ambler (1980) classificou as β-lactamases em 4 grupos distintos: A, B, C e D (RIOS & ALMEIDA,

n.d.). Em *A. baumannii*, todas as classes de β-lactamases já foram identificadas (LEE et al., 2017).

2.5 *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb)

Em função do aparecimento de cepas produtoras de β-lactamases, drogas alternativas foram utilizadas para o tratamento de diversas infecções. A larga administração de antibióticos acarretou no desenvolvimento de enzimas mais versáteis e com um espectro maior de atividade, denominadas β-lactamases de espectro estendido (ESBL). Nos últimos anos, a classe dos carbapenêmicos tem sido amplamente utilizada como tratamento alternativo para infecções por cepas produtoras de ESBL. Contudo, em função da ampla administração dessas drogas, algumas cepas de *A. baumannii* adquiriram mecanismos de resistência a estes antimicrobianos, limitando o controle e tratamento de infecções ocasionadas por esse patógeno (RIOS & ALMEIDA, n.d.).

Dentre os diversos mecanismos descritos em *A. baumannii* que atribuem resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases é o mecanismo de resistência mais relevante associado com a emergência de cepas *A. baumannii* MDR. Como consequência, esses patógenos estão sendo associados a altas taxas de morbidade de mortalidade (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2014). Essa espécie contém genes intrínsecos relacionados com a síntese de carbapenemases, sendo o gene bla_{OXA51} o primeiro a ser relatado. Posteriormente, diversas variantes desse gene foram identificadas e denominados coletivamente como genes $bla_{OXA51\text{-}like.}$ Inicialmente reconhecido como um gene cromossômico exclusivo para a espécie, o mesmo já foi relatado como integrante de plasmídeos em *A. baumannii* na forma IS$Aba1$-$bla_{OXA51\text{-}like}$, sendo detectado também em *A. nosocomialis* e *A. pittii,* demonstrando a capacidade de transferência gênica de fatores de resistência entre espécies distintas (RODRÍGUEZ et al., 2018).

A resistência adquirida em *A. baumannii* ocorre, geralmente, em função da síntese de três tipos de enzimas carbapenemases: β –lactamases de classes A, B e D (BAKOUR et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2018). As β-lactamases de classe A são compostas por um aminoácido serina no sítio ativo e atuam mais eficientemente na degradação de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, sendo algumas enzimas muito eficientes na hidrólise de carbapenêmicos (LEE et al., 2017; RIOS & ALMEIDA, n.d.). Dentro dessa

espécie, as enzimas KPC-2 e GES-14 são as mais frequentemente encontradas (BAKOUR et al., 2014). Contudo, embora haja relatos recorrentes da expressão das enzimas de classe A em *Acinetobacter baumannii*, as β-lactamases de classe B e D são mais comumente relacionadas com o mecanismo de resistência dessa espécie (RODRÍGUEZ et al., 2018).

As β-lactamases de classe B, denominadas também metalo-β-lactamases (MBLs), são enzimas que utilizam zinco ou outro metal pesado como co-fator enzimático e atuam na degradação de todos os β-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Essas enzimas podem ter origem plasmidial ou cromossomal (RIOS & ALMEIDA, n.d.). Em *A. baumannii*, quatro famílias de metalo- β-lactamases já foram reportadas (VIM, IMP, SIM e NDM), sendo diversas variantes alélicas já detectadas (RODRÍGUEZ et al., 2018).

As carbapenemases de classe D, também conhecidas como oxacilinases, são enzimas do tipo serina carbapenemase. Cinco famílias de oxacilinases são encontradas em *Acinetobacter baumannii*, sendo as enzimas do tipo OXA-51-like codificadas no cromossomo da bactéria e as demais (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like) adquiridas por transferência gênica. No geral, essas enzimas possuem uma baixa capacidade de hidrólise de carbapenêmicos. Contudo, diversos estudos relacionam a diminuição da sensibilidade aos carbapenêmicos quando esses genes encontram-se localizados à jusante da sequência de inserção IS*Aba1* (RODRÍGUEZ et al., 2018). Embora essa sequência seja um fator favorável a resistência aos carbapenêmicos, a presença da mesma não é um indicador para a presença dos genes de resistência (TURTON et al., 2006).

2.6 Aspectos epidemiológicos de *Acinetobacter baumannii*

No Brasil, o primeiro surto por bactérias MDR relatado ocorreu em 1999, em Curitiba/PR, e foi associado com a síntese de carbapenemases do tipo OXA23 (VIEIRA & PICOLI, 2015). A América Latina é o continente que mais registra cepas resistentes aos carbapenêmicos, sendo o Brasil e a Argentina os países com maior número de casos reportados em estudos epidemiológicos. Apesar desses estudos não discriminarem as espécies relacionadas, a alta prevalência de *A. baumannii* em ambientes hospitalares sugere uma relação com esses perfis de resistência (RODRÍGUEZ et al., 2018).

Cepas *A. baumannii* são facilmente disseminadas entre pacientes internados e, até mesmo, entre hospitais distintos. Em 1999, um surto relatado Brooklyn, NY, demonstrou a presença de cepas *A. baumannii* MDR em quinze hospitais locais. Um estudo de ribotipagem relevou que um mesmo clone foi identificado em todos os hospitais e foi responsável por 12% dos quadros de infecções (CAMP & TATUM, 2010). Análises recentes de epidemiologia molecular relacionam a maioria dos isolados identificados nos diversos estudos como pertencentes a três principais linhagens clonais disseminadas mundialmente: Complexos clonais I, II e III (CC1, CC2 e CC3, respectivamente) (ALI et al., 2017).

As análises de parâmetros epidemiológicos auxiliam na detecção da localização espacial e temporal dos microrganismos além de avaliar as tendências de aquisição de resistência e capacidade de provocar surtos epidêmicos (VIEIRA & PICOLI, 2015). Essas análises auxiliam no entendimento da dinâmica das infecções e resulta em um melhor planejamento de medidas de controle e ações terapêuticas. Atualmente, a análise de perfis genéticos tem se baseado na técnica de sequenciamento da porção 16s de RNA ribossômico e eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE) (CAMP &TATUM, 2010).

A técnica de PFGE tem sido considerada o ensaio padrão-ouro para a tipagem molecular de isolados *A. baumannii* (RODRÍGUEZ et al., 2018). Essa técnica baseia-se na análise comparativa entre dois ou mais isolados com o intuito de estabelecer um parentesco genômico, geralmente em um contexto epidemiológico (GOERING, 2010). Através de PFGE, é possível identificar perfis geneticamente semelhantes e associá-los com a ocorrência de surtos de infecções por diversos microrganismos, incluindo *A. baumannii* (MOHAJERI, FARAHANI & MEHRABZADEH, 2017).

2.7 Medidas de controle e prevenção de infecções por *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente

Em função das características ubíquas do gênero, cepas *A. baumannii* possuem uma alta versatilidade nutricional e metabólica, acarretando em uma maior capacidade de adaptação em superfícies inanimadas (VIEIRA & PICOLI, 2015). Esses patógenos apresentam elevada capacidade de formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos diversos, favorecendo a permanência a longo prazo em objetos,

equipamentos e materiais médico-hospitalares (BABAPOUR et al., 2016). Além disso, isolados *A. baumannii* possuem habilidade de colonizar a pele de hospedeiros saudáveis sem ocasionar um quadro infeccioso (CAMP & TATUM, 2010). A principal via de transmissão desses patógenos em ambiente hospitalar é através das mãos de profissionais de saúde, de forma que a disseminação para indivíduos imunocomprometidos pode resultar em infecções graves (VIEIRA & PICOLI, 2015). Esse fato evidencia a necessidade de cuidados básicos de higiene e desinfecção como alternativas para barrar a disseminação ambiental destes microrganismos. Estratégias indiretas, como a aplicação de programas de vigilância em epidemiologia, também auxiliam como medidas de controle e prevenção de infecções por *A. baumannii*. Um estudo conduzido em um hospital universitário de São Paulo demonstrou que a implementação de um programa de vigilância epidemiológica reduziu em 80% as culturas positivas para *A. baumannii* (VIEIRA & PICOLI, 2015).

Devido ao aumento de cepas *A. baumannii* MDR, a aplicação de medidas terapêuticas tem se restringido a um baixo número de antibacterianos disponíveis e eficazes para uso em humanos. Atualmente, o tratamento de escolha para infecções por CRAB limita-se ao uso de polimixina B e colistina (polimixina E) (VIEIRA & PICOLI, 2015). Entretanto, alguns estudos sugerem que, embora a resistência as polimixinas seja raramente relatada, a eficácia clínica desse medicamento tem se demonstrado baixa, até mesmo quando a concentração inibitória mínima (MIC) encontra-se na faixa de suscetibilidade (MARTINS & BARTH, 2013) .

3 Hipóteses e Objetivos

3.1 Hipóteses

Isolados *A. baumannii* MDR são comumente encontradas em ambientes hospitalares e apresentam elevado potencial de persistência ambiental e capacidade de adquirir mecanismos de resistência. A resistência aos carbapenêmicos é elevada nestes ambientes e está associada, em sua maioria, com a síntese de enzimas carbapenemases de classe B e D.

3.2 Objetivo geral

Identificar, avaliar os mecanismos de resistência e estabelecer o perfil genético de vinte e dois isolados *Acinetobacter* spp. MDR obtidos de um hospital localizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil.

3.3 Objetivos específicos

- Identificar os isolados a nível de espécie através de PCR multiplex dos genes *gyrB* e $bla_{OXA51\text{-}like}$;
- Analisar os perfis de resistência dos isolados a cinco diferentes classes de antimicrobianos (carbapenêmicos, fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos);
- Avaliar a relação genética dos isolados através da técnica PFGE;
- Correlacionar os isolados coletados em diferentes períodos e setores hospitalares;
- Identificar os mecanismos enzimáticos associados a resistência aos carbapenêmicos através de ensaio fenotípico (Teste de Hodge);
- Identificar, através de análise molecular, a presença de genes de resistência associados com a síntese de carbapenemases de classes B e D.

4 Capítulos

4.1 Manuscrito

Identificação, epidemiologia molecular e mecanismos de resistência associados à *Acinetobacter* multidroga-resistentes isolados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.

Stella Buchhorn de Freitas [1,2], Marcos Roberto A. Ferreira [1], Bárbara Couto Roloff [1], Clóvis Moreira Jr. [1], Fabricio Rochedo Conceição [1], Daiane Drawanz Hartwig [1,2,*]

[1]Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, CEP 96160-000, Brazil.

[2]Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

*Autor de correspondência: Daiane Drawanz Hartwig, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010–900, Pelotas, RS, Brazil. Tel. +55 53 3275 7616; Fax +55 53 3275 7551. Email: daianehartwig@gmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: O complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (ACB) compreende um grupo de patógenos oportunistas associados a surtos de infecções em ambientes hospitalares. *A. baumannii* é a espécie mais relevante em aspectos clínicos e epidemiológicos em função de sua destacada capacidade de desenvolver resistência às diferentes classes de antibacterianos disponíveis atualmente. OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi identificar as espécies, estabelecer o perfil genético e avaliar a resistência aos antimicrobianos e síntese de carbapenemases em isolados clínicos ACB coletados de outubro de 2014 à julho de 2016, em um hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil. METODOLOGIA: Vinte e dois isolados ACB foram caracterizados a nível de espécie através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex utilizando os genes *gyrB* e $bla_{OXA51\text{-}like}$ e quanto a relação genética através da técnica de

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Os perfis de resistência aos antibacterianos foram avaliados através da técnica de Disco-Difusão em Ágar e os isolados resistentes a classe dos carbapenêmicos foram avaliados também quanto à produção de carbapenemases através do Teste de Hodge Modificado (THM). A técnica de PCR foi empregada para avaliar o perfil molecular de resistência dos isolados para os genes $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-58}}$, bla_{VIM} e sequência de inserção *ISAba*1. RESULTADOS: Todos os isolados avaliados neste estudo foram caracterizados como pertencentes a espécie *A. baumannii*. A análise de PFGE detectou a presença de quatorze perfis genéticos, sendo o clone E o mais prevalente (22,7%). Os maiores percentuais de resistência foram observados para a classe das cefalosporinas, onde 100% dos isolados apresentaram resistência a todos os antibacterianos desta classe. Já para os carbapenêmicos, 95,4% dos isolados foram classificados como resistentes ao meropenem, enquanto 77,3% foram resistentes ao imipenem. Para a produção de carbapenemases, o THM revelou 95,4% dos isolados como produtores de carbapenemases e o gene bla_{VIM} foi identificado em 90,9% dos isolados. A sequência de inserção *ISAba1* foi identificada em 100% dos isolados analisados. CONCLUSÃO: Este estudo demonstrou elevada ocorrência de *A. baumannii* multirresistentes no ambiente hospitalar. Isolados coletados no período de dois anos demonstraram relação genética, assim como o mesmo clone foi identificado em setores distintos do hospital, evidenciando a capacidade de disseminação e persistência no ambiente. Além disso, esses patógenos demonstraram resistência a carbapenêmicos e a síntese de carbapenemases foi identificada como um importante mecanismo de resistência.

INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende um grupo de microrganismos Gram-negativos, catalase-postivos, oxidase-negativos, não móveis e não fermentadores do tipo cocobacilos, pertencentes a família *Moraxellaceae* e ordem *Gammaproteobacteria* (Peleg, Seifert & Paterson, 2008; Martins & Barth, 2013). Mais de cinquenta espécies são relatadas como integrantes desse gênero, das quais cinco são de grande relevância clínica por serem consideradas patógenos oportunistas em humanos (Harding, Hennon & Feldman, 2017). Em razão das semelhanças fenotípicas e a estreita relação genética, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* e *A. calcoaceticus* são agrupadas no chamado complexo *A. calcoaceticus* – *A.*

baumannii (ACB), sendo *A. calcoaceticus* considerado um microrganismo ambiental e não relacionado com patologias humanas graves (Higgins *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014; Harding, Hennon & Feldman, 2017).

Nas últimas décadas, isolados de *A. baumannii* multidroga-resistentes (MDR-Ab) tem sido relatados em consequência da habilidade destas bactérias adquirirem genes de resistência para a grande maioria dos antibacterianos disponíveis (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014; de Campos *et al.*, 2016). Os antibióticos da classe dos carbapenêmicos são considerados os agentes de escolha no tratamento de MDR-Ab (Turton *et al.*, 2006; Rodríguez, Nastro & Famiglietti, 2018). Entretanto, o aparecimento de cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (CRAb) tem sido relatadas mundialmente e acarretam em um grande problema de saúde pública em função da limitação de opções terapêuticas para essas infecções (Wang *et al.*, 2014). A resistência aos carbapenêmicos tem sido relacionada, principalmente, com a síntese de β-lactamases de classe B (metalo-β-lactamases) e de enzimas de classe D (oxacilinases) (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014). Além disso, a capacidade de persistir e resistir sob condições ambientais desfavoráveis, que afetam a grande maioria dos patógenos bacterianos, associada a capacidade formadora de biofilmes, são fatores que favorecem a colonização bacteriana em superfícies de equipamentos hospitalares, induzindo persistência a longo prazo, resistência a ambientes hostis e dificuldade de sua completa eliminação (Babapour *et al.*, 2016; Harding, Hennon & Feldman, 2017).

Mesmo diante de diversas semelhanças entre as espécies bacterianas pertencentes ao complexo ACB, é de fundamental importância a correta identificação desses isolados, uma vez que existem consideráveis diferenças nos aspectos clínicos e epidemiológicos entre as espécies (Higgins *et al.*, 2010). As espécies pertencentes ao complexo ACB são de difícil identificação através de ensaios bioquímicos e, por isso, métodos moleculares, como sequenciamento dos genes 16S rRNA e da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e PCR multiplex do gene *gyrB* têm sido empregados com essa finalidade (Li *et al.*, 2016). Além da identificação dos isolados do complexo ACB, estudos de epidemiologia molecular de isolados resistentes a carbapenêmicos, associados com a identificação dos mecanismos envolvidos na resistência à essas drogas, possibilitam o entendimento da dinâmica das infecções nosocomiais e auxiliam no desenvolvimento e implantação de medidas de controle efetivas.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi identificar, caracterizar e determinar a relação genética entre vinte e dois isolados clínicos do complexo ACB multidroga-resistentes, obtidos em um hospital localizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Além disso, objetivou-se estabelecer os mecanismos de resistência associados a estes isolados através de ensaios fenotípicos e moleculares.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Vinte e dois isolados nosocomiais pertencentes ao complexo ACB foram coletados de pacientes com suspeita de infecção e doados pelo Laboratório de Microbiologia de um hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil. Esses isolados foram identificados pelo sistema automatizado VITEK II (bioMérieux, France) e armazenados a -20 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 10% de glicerol (v/v).

Identificação das espécies do complexo ACB

O DNA de cada isolado bacteriano foi extraído através do método térmico (100 °C por 10 min). A identificação molecular foi realizada por PCR multiplex para os genes *gyrB* e $bla_{OXA51\text{-like}}$, conforme descrito por Lee et al. (2013). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. Foram utilizados os *primers* que amplificam a sequência de 1500 pb correspondente a região espaçadora 16S-23S rRNA (região ITS) como controle interno. A primeira multiplex foi realizada utilizando os *primers SP2*-for, *SP4*-for e *SP4*-rev que amplificam sequências intergênicas de *gyrB* em *A. baumannii* (490 e 294 pb) e *A. nosocomialis* (294 pb) (Higgins *et al.*, 2007). Isolados positivos nesta etapa foram confirmados como *A. baumannii* através da amplificação do gene $bla_{OXA51\text{-like}}$ que codifica uma enzima carbapenemase específica para a espécie. *Primers SP1*-for, *SP1*-rev, *SP3*-for e *SP3*-rev foram utilizados para a identificação de *A. pittii* e *A. calcoaceticus* através da amplificação de sequências de 194 e 428 pb, respectivamente (Higgins *et al.*, 2010). Para cada reação, foram utilizados 13 µL de *Go Taq® Colorless Master Mix* (Promega, EUA), 1 µL de cada *primer*, 5 µL de DNA genômico, completando o volume final para 25 µL com água ultrapura. As condições de amplificação foram: 94 °C – 2 min; 30 ciclos: 94 °C – 1 min, 61 °C – 30 s, 72 °C – 1 min; 72 °C – 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose 2% e corados com solução de brometo de etídio.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados para identificação molecular de isolados do complexo ACB por PCR multiplex.

Gene	*Primer*	Sequência de nucleotídeos 5'-3'	Produto da PCR (pb)	Espécies *Acinetobacter* spp.	Referências
ITS	*ITS*-for *ITS*-rev	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA GGGTTYCCCCRTTCRGAAAT	1500	*Acinetobacter* spp.	(Chang *et al.*, 2005)
gyrB (1 PCR multiplex)	*SP2*-for *SP4*-for *SP4*-rev	GTTCCTGATCCGAAATTCTCG CACGCCGTAAGAGTGCATTA AACGGAGCTTGTCAGGGTTA	294 490	*A. baumannii* *A. baumannii* + *A. nosocomialis*	(Higgins *et al.*, 2007)
gyrB (2 PCR multiplex)	*SP1*-for *SP1*-rev *SP3*-for *SP3*-rev	GACAACAGTTATAAGGTTTCAGGTG CCGCTATCTGTATCCGCAGTA GATAACAGCTATAAAGTTTCAGGTGGT CAAAAACGTACAGTTGTACCACTGC	428 194	*A. calcoaceticus* *A. pittii*	(Higgins *et al.*, 2010)
$bla_{OXA51\text{-}like}$	$bla\text{-}_{Oxa51\text{-}like}$-for $bla\text{-}_{Oxa51\text{-}like}$-rev	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	*A. baumannii*	(Woodford *et al.*, 2006)

Análise dos perfis de resistência aos antibacterianos

A suscetibilidade aos agentes antibacterianos foi avaliada através do método de Kirby-Bauer, conhecido também como teste de Disco-Difusão em Ágar, para diferentes grupos de antibacterianos, conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Doze antibacterianos, pertencentes à 5 classes (penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, carbapenêmicos e aminoglicosídeos) foram aplicados no teste. Os isolados foram cultivados em Ágar BHI (DIFCO) por 18-24 h à 37 °C e, posteriormente, foi feito um inóculo com suspensão bacteriana em solução de cloreto de sódio 0,9%, sendo a concentração ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~10^8 UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* estéril, a suspensão bacteriana foi inoculada sobre uma placa de Ágar Mueller-Hinton (MH-Sigma-Aldrich, EUA) e, após secar por 15 min, discos impregnados com os antibióticos foram adicionados. As placas foram incubadas por 16-18 h sob temperatura de 37 °C. *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle para o teste.

Teste de Hogde Modificado (THM) para identificação fenotípica de carbapenemases

Todos os isolados com perfil de resistência aos carbapenêmicos foram submetidos ao THM, conforme determinações do CLSI (2015). Um cultivo de *E. coli* ATCC 25922 foi preparado e ajustado em concentração de 1 x 10^8 UFC/mL, correspondente a 0,5 na escala de McFarland e, posteriormente, diluído em solução salina (0,9% NaCl) na proporção de 1:10. Com o auxílio de um *swab* estéril, o inóculo diluído

foi semeado em uma placa de Petri contendo Ágar MH (Sigma-Aldrich). Um disco de meropenem 10 µg (Laborclin, Brasil) foi adicionado na região central da placa e, com uma alça de platina, foram feitas estrias com os isolados teste da região central em direção à periferia da placa. As placas foram incubadas à 37 °C por um período de 16-18 h e os ensaios foram realizados em duplicata em três experimentos distintos. Em cada placa, realizou-se a análise de 2 isolados do complexo ACB, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 utilizada como controle negativo e um isolado de *K. pneumoniae* positivo para a produção de enzima KPC.

Detecção de genes associados a síntese de carbapenemases

Todos os isolados foram analisados quanto a presença de genes de resistência relacionados com a síntese de oxacilinases, conforme descrito por de Campos et al. (2016). Para tal, foram realizadas análises pela técnica de PCR para amplificação de fragmentos dos seguintes genes: $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$ e $bla_{\text{OXA-58}}$. Os isolados também foram analisados quanto a presença da sequência de inserção IS*Aba*1, um elemento genético móvel associado com a presença de sequências promotoras que elevam a expressão de carbapenemases (Carvalho, 2013). Sequências do gene bla_{VIM}, associado com a síntese de metalo-β-lactamases, também foram analisadas (Carvalho, 2013). A relação de *primers* utilizados segue descrita na Tabela 2. Para cada reação, foram utilizados 13 µL de *Go Taq® Colorless Master Mix* (Promega, EUA), 1 µL de cada *primer*, 5 µL de DNA genômico, completando o volume final para 25 µL com água ultrapura. As condições das reações foram: 95 °C – 5 min; 30 ciclos: 94 °C – 25 s, 58 °C – 40 s, 72 °C – 50 s; 72 °C – 6 min. Os produtos de PCR foram analisados através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio para visualização dos fragmentos.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de genes de resistência associados a síntese de carbapenemases.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos 5'-3'	Produto PCR (pb)	Referências
bla$_{OXA-23}$	*OXA-23*-for *OXA-23*-rev	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	501	Woodford *et al.*, 2007
bla$_{OXA-24}$	*OXA-24*-for *OXA-24*-rev	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	Woodford *et al.*, 2008
bla$_{OXA-58}$	*OXA-58*-for *OXA-58*-rev	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	Woodford *et al.*, 2009
*ISAba*1	IS*Aba1*-for IS*Aba1*-rev	CACGAATGCAGAAGTTG CGACGAATACTATGACAC	549	Segal *et al*., 2005
bla$_{VIM}$	*VIM*-for *VIM*-rev	GTTTGGTCGCATATCGCAAC CTACTCAACGACTGAGCGATTTGT	390	Ellington *et al*., 2007

***Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE)**

Os isolados ACB foram cultivados em Caldo BHI por 18 h à 37 °C. A suspensão de células foi ajustada na DO_{600nm} = 3. O protocolo de extração do DNA "*in situ*" e a digestão com enzima *Apa*I (Promega, EUA) do DNA fixado em "plugs" de agarose (Bio-Rad, EUA) foi realizado como descrito por Seifert et al. (2005). DNA de *Salmonella* Braenderup H9812 digerido com enzima *Xba*I (Thermo Scientific, EUA) foi utilizado como marcador universal de peso molecular (HUNTER et al., 2005). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (BioRad, EUA) em TBE 1X a 14 °C em sistema CHEF DR-II (Bio-Rad, EUA). O padrão de eletroforese foi: Bloco 1 - 200 V, tempo inicial de 5 s, tempo final de 20 s, por 19 h. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos, lavados com água destilada por 40 minutos e foto-documentados no sistema L-PIX touch, Loccus. Os padrões de macro-restrição foram analisados no *software* Bionumerics (versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). A análise dos padrões obtidos na PFGE foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade Dice, com tolerância de 1%. O dendrograma foi construído por agrupamento aos pares pela média aritmética não ponderada (UPGMA).

RESULTADOS

Isolados bacterianos

Dos vinte e dois isolados clínicos obtidos de pacientes internados entre outubro de 2014 e julho de 2016, 50% (11) foram coletados de pacientes do sexo masculino e 50% (11) foram coletados de pacientes do sexo feminino, sendo todos os pacientes com idades superiores a 60 anos. As origens de coleta foram as seguintes: secreção escara sacral (1), aspirado traqueal (13), ponta de intracatéter (1), hemocultura (4), escarro (2) e secreção de úlcera varicosa (1). Todos os isolados foram identificados pelo sistema VITEK 2 como pertencentes ao complexo ACB.

Identificação molecular dos isolados ACB

Quando submetidos a PCR multiplex com os *primers SP2*-for, *SP4*-for e *SP4*-rev, treze isolados apresentaram fragmentos correspondentes a 294 e 490 pb. Nove isolados apresentaram apenas as amplificações referentes a sequência de 294 pb. Nenhum dos isolados teve ausência de amplificação na primeira PCR multiplex, eliminando a necessidade de confirmação quanto as espécies *A. calcoaceticus* e *A. pittii* através da segunda PCR multiplex. O fragmento de 353 pb referente ao gene $bla_{\text{oxa-51}}$ foi identificado em todos os isolados analisados, estabelecendo a confirmação molecular dos isolados como pertencentes a espécie *A. baumannii*.

Perfis de resistência aos antibacterianos

Todos os isolados foram analisados quanto aos perfis de resistência através do teste de disco-difusão em Ágar MH. A classe das cefalosporinas foi a que apresentou maior número de isolados resistentes, onde todos os isolados testados apresentaram resistência aos 5 antibacterianos testados. Todos os isolados apresentaram resistência a ampicilina, enquanto 59% apresentaram resistência a ampicilina/sulbactam. 95,4% dos isolados foram resistentes a ciprofloxacina, 81,8% a gentamicina e 45,4% foram resistentes a amicacina (Tabela 3). Para a classe dos carbapenêmicos, 95,4% dos isolados foram classificados como resistentes ao meropenem, enquanto 77,3% apresentaram resistência ao imipenem. Apenas dois isolados foram classificados como sensíveis ao imipenem e os mesmos apresentaram-se como resistentes quando testados com o meropenem (Tabela 4). Seis isolados (27,3%) apresentaram resistência

a todos os antibióticos analisados. Dezessete isolados (77,3%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico de cada classe analisada.

Tabela 3 – Perfis de resistência aos antibacterianos em isolados coletados de pacientes internados em dois hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

Classe	Antibacteriano	Perfil de sensibilidade[a]		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilinas	Ampicilina	100 (22)	0 (0)	0 (0)
	Ampicilina/sulbactam	59.0 (13)	13.6 (3)	27.3 (6)
Cefalosporinas	Cefuroxima	100 (22)	0 (0)	0 (0)
	Axetilcefuroxima	100 (22)	0 (0)	0 (0)
	Cefoxetina	100 (22)	0 (0)	0 (0)
	Ceftriaxona	100 (22)	0 (0)	0 (0)
	Cefepime	100 (22)	0 (0)	0 (0)
Carbapenêmicos	Imipenem	77.3 (17)	13.6 (3)	9.0 (2)
	Meropenem	95.4 (21)	4.6 (1)	0 (0)
Aminoglicosídeos	Amicacina	45.4 (10)	27.3 (6)	27.3 (6)
	Gentamicina	81.8 (18)	0 (0)	18.2 (4)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	95.4 (21)	4.6 (1)	0 (0)

[a] Porcentagem (número) de isolados de acordo com os perfis de sensibilidade aos antibacterianos

Detecção de carbapenemases

Todos os isolados foram submetidos ao teste, uma vez que todos apresentaram-se intermediários ou resistentes ao meropenem. Vinte e um isolados foram caracterizados como positivos, correspondente a 95,4% do total de isolados analisados. De acordo com a interpretação do ensaio, apenas um isolado (4,3%) foi classificado como não produtor da enzima carbapenemase.

O gene bla_{VIM} foi detectado em 90,9% dos isolados (Tabela 4). Dois isolados (9%) positivos no THM não tiveram nenhum dos genes de carbapenemases detectados pela técnica de PCR. As sequências correspondentes aos genes $bla_{\mathrm{oxa\text{-}23}}$, $bla_{\mathrm{oxa\text{-}24}}$ e $bla_{\mathrm{oxa\text{-}58}}$ não foram identificadas em nenhum dos isolados analisados neste trabalho. Todos os isolados apresentaram a sequência de inserção IS*Aba*1, correspondente a um fragmento de 549 pb na PCR.

Tabela 4 – Resultados do perfil de resistência aos carbapenêmicos e produção de carbapenemases.

Perfil dos isolados[a]	Antibiograma[b]		THM[b]	PCR[b]
	Meropenem	Imipenem	Meropenem	*bla*$_{VIM}$
Resistente/Positivo	95,4 (21)	77,3 (17)	95,4 (21)	90,9 (20)
Intermediário/Indefinido	4,6 (1)	13,6 (3)	0 (0)	-
Sensível/ Negativo	0 (0)	9 (2)	4,6 (1)	9 (2)
Total	100 (22)	100 (22)	100 (22)	100 (22)

[a]Avaliação quanto ao perfil de resistência/resultado do Teste de Hodge e presença de carbapenemases. [b]Porcentagem (número) de isolados de acordo com os perfis de sensibilidade aos antibacterianos, resultados positivos no Teste de Hodge e presença de carbapenemases.

Perfis genéticos dos isolados

Na PFGE uma diversidade de 14 perfis genéticos foi observada e os mesmos foram classificados com letras de A à N (Figura 1). Os isolados foram considerados pertencentes ao mesmo clone quando observada similaridade ≥ 85% (Reyes *et al.*, 2017). O clone E foi o mais frequentemente encontrado, estando relacionado com 22,7% dos isolados coletados nos meses de outubro e novembro de 2014. O mesmo clone foi relacionado a quatro isolados obtidos de pacientes distintos, sendo três deles coletados de pacientes internados na UTI do hospital e um coletado de outro setor hospitalar. Com exceção deste último, todos os isolados demonstraram a presença do gene *bla*$_{VIM}$ em seu conteúdo genético. Além disso, dois isolados coletados de pacientes distintos internados na UTI apresentaram perfil de resistência a gentamicina, não observado nos outros isolados pertencentes ao grupo. Os clones D e H também foram relacionados a mais de um isolado e tiveram prevalências de 18,2% e 9%, respectivamente. Quatro isolados pertencentes ao clone D foram coletados de dois pacientes alocados em dois setores hospitalares distintos (UTI e Sagrado). Destes, todos os isolados foram identificados como portadores do gene *bla*$_{VIM}$. Os dois isolados pertencentes ao clone H foram identificados nos anos de 2014 e 2016 em dois setores hospitalares diferentes dos anteriores. Ambos os isolados foram positivos para o gene *bla*$_{VIM}$ na técnica de PCR. Metade dos isolados (50%) foram identificados como pertencentes a 11 perfis genéticos distintos (Tabela 5).

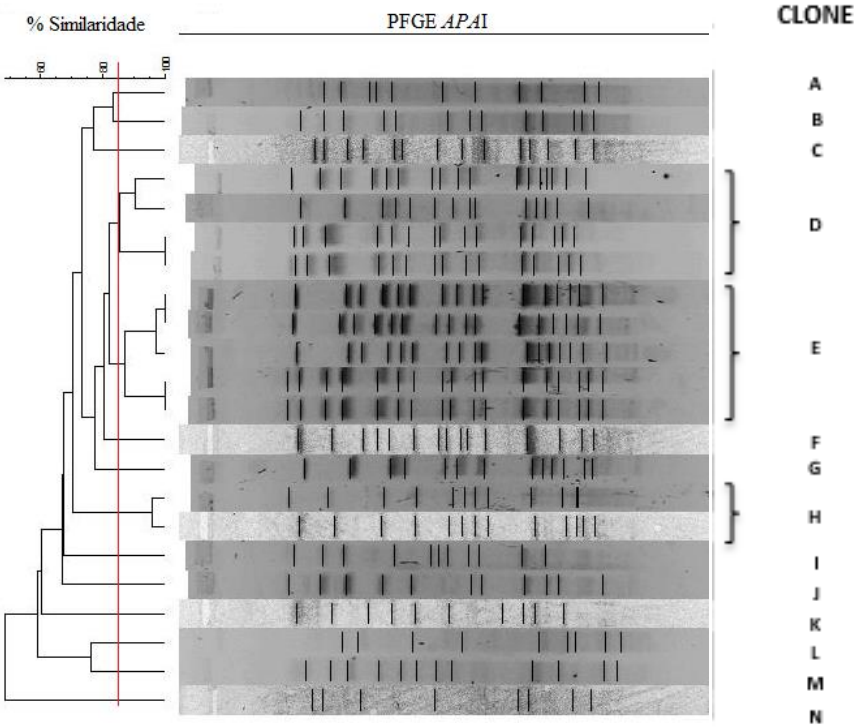

Figura 1– **Dendograma construído a partir dos perfis genéticos de isolados de *A. baumannii* coletados em hospital de Pelotas, RS, Brasil.** Isolados pertencentes ao mesmo clone apresentaram similaridade ≥ 85%.

Tabela 5 – Relação dos isolados quanto aos perfis genéticos e resistência aos antimicrobianos.

Clone	Isolado	Data de coleta	Sexo	Setor hospitalar	Nº prontuário	Perfis de Resistência[a]
A	SC13	18/11/14	F	UTI	258557	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, GEN, AMK, SAM
B	SC20	05/12/14	M	S. Antônio 2	258659	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, GEN, AMK, SAM
C	SC39	20/05/2016	M	UTI	233904	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, AMK
D	SC07	10/11/2014	F	UTI	258557	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, SAM
	SC10	13/11/2014	M	Sagrado	257449	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN
	SC14	18/11/2014	F	UTI	258557	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, AMK SAM
	SC15	25/11/2014	F	UTI	258557	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, AMK, SAM
E	SC03	19/10/2014	F	Medianeira	258296	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, CIP
	SC04	20/10/2014	F	UTI	117738	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, CIP, AMK
	SC05	22/10/2014	M	UTI	253301	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, SAM
	SC06	01/11/2014	F	UTI	258557	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, SAM
	SC09	11/11/2014	F	UTI	117738	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP
F	SC47	13/02/2016	M	UCTI	269345	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, AMK SAM
G	SC02	19/10/2014	M	UTI	258460	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, AMK, SAM
H	SC01	18/10/2014	M	São João	257410	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN AMK
	SC60	15/07/2016	M	UCTI	105061	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, SAM
I	SC11	13/11/2014	F	Ambulatório	256967	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, CIP
J	SC08	10/11/2014	F	UTI	259008	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, CIP, GEN, AMK
K	SC56	07/07/2016	M	UTI	272339	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, GEN, SAM
L	SC28	05/01/2015	M	UTI	254987	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN, SAM
M	SC29	07/01/2015	M	UTI	254987	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, MEM, IMP, CIP, GEN
N	SC34	12/04/2016	F	Sagrado	114920	AMP, CRX, CRXA, FOX, CRO, FEP, CIP, GEN, SAM

[a]Avaliação dos isolados quanto ao perfil de resistência aos antibacterianos: AMP (ampicilina), CRX (cefuroxima), CRXA (cefuroxima Axetil), FOX (cefoxetina), CRO (ceftriaxona), FEP (cefepime), MEM (meropenem), IMP (imipenem), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), SAM (ampicilina+sulbactam), AMK (amicacina).

DISCUSSÃO

A correta identificação de isolados *Acinetobacter* spp. em ambientes hospitalares é de extrema importância, uma vez que cada espécie apresenta diferentes manifestações clínicas e epidemiológicas (Higgins *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017). Um estudo com 495 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., desenvolvido por Lee *et al.* (2014) demonstrou, através de uma análise comparativa entre PCR multiplex de *gyrB* e o sistema VITEK2, acurácias de 90,5% e 76,6%, respectivamente. Além disso, o mesmo estudo relatou 100% de concordância para identificação das espécies pertencentes ao complexo ACB. Em nosso estudo, quando submetidos a PCR multiplex para triagem das espécies *A. baumannii* e *A. nosocomialis*, todos os isolados apresentaram fragmentos correspondentes a 490pb e/ou 294pb. A amplificação da carbapenemase intrínseca OXA51 foi confirmada em todos os isolados, evidenciando a presença de 100% da espécie *A. baumannii* entre os isolados analisados. Teixeira e colaboradores (2016) realizaram um estudo com 118 isolados coletados em hospitais da região sul do Brasil, onde demonstraram 100% de concordância entre técnica de PCR multiplex de *gyrB* e o sequenciamento da região ITS. Além disso, o estudo identificou 90,6% dos isolados como pertencentes a espécie *A. baumannii*, evidenciando a elevada prevalência dessa espécies em ambientes hospitalares, semelhante ao que foi observado no nosso estudo (Teixeira *et al.*, 2016).

De acordo com os perfis de resistência observados, todos os isolados foram caracterizados como multidroga-resistentes (MDR). Em nosso estudo, observamos uma elevada resistência a todos os antibacterianos da classe das cefalosporinas (100%), incluindo cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, amplamente utilizadas para tratamento de infecções por patógenos Gram-negativos produtores de β-lactamases comuns (Rios & Almeida, n. d.). Esses dados podem estar relacionados com a síntese de β-lactamases de espectro estendido (ESBL), altamente potentes na degradação desses antimicrobianos. A ampla resistência aos carbapenêmicos, observadas em 95,4% dos isolados, evidencia o crescente desenvolvimento de cepas CR*Ab* dentro de ambiente hospitalar, culminando em diversas limitações terapêuticas no tratamento de pacientes infectados por *A. baumannii*. O sulbactam é um inibidor de β-lactamase com excelente ação bactericida e tem sido combinado com antibióticos β-lactâmicos com o intuito de ampliar o espectro de atividade desses antibacterianos. A combinação ampicilina/sulbactam tem

sido utilizada como um tratamento alternativo para infecções causadas por cepas resistentes aos carbapenêmicos (Vieira & Picoli, 2015). Alguns estudos demonstram que algumas cepas, mesmo apresentando alta resistência aos carbapenêmicos, retém sensibilidade *in vitro* para esses compostos. Entretanto, em nosso estudo, observamos a prevalência de 59% dos isolados resistentes a ampicilina/sulbactam, sendo que os mesmos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Desta forma, a presença de isolados CR*Ab* resistentes também a esses antibióticos é um fator que gera elevada preocupação, pois limitam a terapia à utilização de antibacterianos de última linha, como as polimixinas, que acarretam em efeitos nefrotóxicos em 36% dos pacientes (Kanafani & Kanj, 2018).

Dos vinte e dois isolados analisados neste estudo, apenas um isolado foi caracterizado como não produtor de enzimas carbapenemases através do THM. Este mesmo isolado apresentou resistência intermediária ao imipenem e meropenem e a presença do gene bla_{VIM} foi identificada em seu genoma. Apesar de demostrar boas correlações com análises de PCR, o THM trata-se de uma análise fenotípica e, portanto, sua interpretação pode ser subjetiva. Alguns estudos já demonstraram resultados falso-negativos associados a esta técnica (Carvalho, 2013). Contudo, cabe ressaltar que, embora a produção de carbapenemases seja o principal mecanismo associado a resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos, a presença de genes nem sempre acarretarão em sua expressão, assim como outros fatores podem estar associados a esses perfis de resistência, como a superexpressão de bombas de efluxo, alterações nos sítios de ligação de proteínas ligadoras de penicilina e a diminuição da expressão de porinas de membrana externa (OMPs- *outer membrane proteins*) (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014).

A presença de β-lactamases de classe B e D (metalo-β-lactamases e oxacilinases, respectivamente), são os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *A. bamumannii* (Lee *et al.*, 2017). Em nosso estudo, observamos a presença dos genes $bla_{\mathrm{oxa\text{-}51}}$ e a sequência de inserção IS*Aba*1 em 100% dos isolados. O $bla_{\mathrm{oxa\text{-}51}}$ é um gene intrínseco de *A. baumannii* que está associado a síntese de uma carbapenemase de classe D que, na maioria dos casos, apresenta baixos níveis de expressão e um consequente potencial reduzido de alterar a susceptibilidade dos isolados aos antibióticos, incluindo os carbapenêmicos (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014). Entretanto, sua ação enzimática, assim como nas demais oxacilinases, está geralmente relacionada com a presença da sequência IS*Aba*1 localizada na porção 5’ do

cassete gênico (Rodríguez, Nastro & Famiglietti, 2018). Embora sua localização e a relação com esses genes só possam ser determinadas através de um sequenciamento do genoma dos isolados, a expressão de IS*Aba*1- bla_{oxa-51} pode estar relacionada com os dois isolados confirmados como produtores de carbapenemases no THM, cujas outras enzimas (OXA-23, OXA-24, OXA-58 e VIM) não foram identificadas. Além disso, diversos outros genes não analisados podem estar relacionados com estes quadros de resistência, como NDM-1, SIM-1, OXA-143 e OXA-235 (Rodríguez, Nastro & Famiglietti, 2018).

Nosso estudo evidenciou uma elevada prevalência de genes codificadores de carbapenemases de classe B (metalo-β-lactamases), sugerindo a relação dessas enzimas com os mecanismos de resistência associados. As carbapenemases OXA-23 e suas variantes são as mais comumente encontradas em isolados com perfis de resistência aos carbapenêmicos (Rocha *et al.*, 2017). Entretanto, em nosso estudo não observamos a presença dessa enzima, assim como as carbapenemases OXA-24 e OXA-58 também não foram identificadas. Ferreira et al (2011) demonstrou a baixa prevalência do gene bla_{oxa-23} (1,4%) e a ausência dos genes bla_{oxa-24} e bla_{oxa-58} em 77 isolados resistentes aos carbapenêmicos coletados em hospitais de Porto Alegre/RS (Ferreira *et al.*, 2011). Um desfecho semelhante foi visualizado em um estudo realizado em 2017 por Rocha e colaboradores onde, de 31 isolados coletados no estado do Rio Grande do Sul, apenas um isolado apresentou o gene $bla_{oxa-24,}$ enquanto a presença do gene bla_{oxa-58} não foi observada em nenhum dos isolados analisados. Entretanto, neste mesmo estudo, foi observada uma alta prevalência (99%) de isolados portadores do gene bla_{oxa-23} (Rocha *et al.*, 2017). Ambos os estudos evidenciam a baixa prevalência de enzimas OXA-24 e OXA-58 no estado do Rio Grande do Sul, enquanto a baixa prevalência de OXA-23 pode ser um fator observado na região sul do estado.

De acordo com a análise dos perfis genéticos dos isolados, pudemos observar uma elevada variabilidade de linhagens clonais dentro do ambiente hospitalar. O clone E, relacionado com 22,7% dos isolados, foi identificado em quatro pacientes, evidenciando a capacidade de disseminação desses patógenos entre indivíduos. O mesmo clone foi identificado em dois setores hospitalares distintos, o que corrobora com os estudos de disseminação ambiental em objetos, equipamentos e utensílios médico-hospitalares. Além disso, diversos estudos enfatizam que a principal via de transmissão desses patógenos

nestes ambientes é através das mãos de profissionais de saúde, evidenciando a necessidade de melhorias nas medidas de controle de desinfecção e higiene (Vieira & Picoli, 2015). O mesmo perfil genético foi identificado em dois isolados com um intervalo de dois anos entre as coletas. Esses dados promovem o entendimento da capacidade de permanência desses patógenos mesmo sob condições adversas para seu estabelecimento. Essa capacidade pode estar atrelada com a formação de biofilmes e resistência aos antimicrobianos e desinfetantes, facilitando a durabilidade a longo prazo e a consequente disseminação para outros ambientes (Babapour *et al.*, 2016). Além disso, a presença de genes associados com as síntese de carbapenemases também foi identificada e, através da análise dos perfis de resistência, foi possível observar a perda de sensibilidade a antimicrobianos, como a gentamicina, em isolados geneticamente semelhantes.

CONCLUSÃO

Em nosso estudo, observamos 100% de prevalência da espécie *A. baumannii* em isolados coletados em hospital localizado na cidade de Pelotas, RS. 27.3% dos isolados apresentaram resistência aos diversos antibacterianos testados e a presença de carbapenemase de classe B foi identificada em 90.9% dos isolados. 100% e 95.4% dos isolados apresentaram resistência às cefalosporinas de 3ª e 4º geração e carbapenêmicos, respectivamente, sendo ambas as classes de antibacterianos amplamente utilizadas como tratamento para essas infecções. A análise dos perfis genéticos proporcionou uma avaliação sobre o processo de disseminação desses patógenos entre setores hospitalares, salientando a necessidade de melhores cuidados de higiene e desinfecção de objetos e equipamentos a fim de evitar a contaminação cruzada. Foi possível observar a aquisição de resistência a antimicrobianos em isolados geneticamente semelhantes, evidenciando a alta capacidade de adaptação desses patógenos em ambientes considerados hostis em função de elevada administração de antibacterianos. Além disso, pudemos comprovar a persistência de isolados de *A. baumannii* por longos períodos de tempo, evidenciando a dificuldade de eliminação desses patógenos. Sendo assim, nossos resultados reafirmam a necessidade de maiores medidas de controle e desinfecção dentro do ambiente hospitalar, bem como evidencia a prioridade de medidas terapêuticas para conter a propagação desses microrganismos.

REFERÊNCIAS

1. Alcántar-Curiel, M. D. *et al.* (2014) 'Molecular Mechanisms Associated with Nosocomial Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico', *Archives of medical research*, 45, pp. 553–560.
2. Babapour, E. *et al.* (2016) 'Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Elsevier Ltd, 6(6), pp. 528–533.
3. de Campos, P. A. *et al.* (2016) 'Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes', *Current Microbiology*, 72(5), pp. 617–627.
4. Carvalho, K. R. (2013) Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro. *Tese (doutorado em vigilância sanitária),* Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
5. Chang, H. C. *et al.* (2005) 'Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region', *Journal of clinical microbiology*, 43(4), pp. 1632-39.
6. Chen, T. L. *et al.* (2014) 'Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay', *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 9), pp. 1154–1159.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) *'M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing'*, 28th Edition.
8. Ellington, M. J. *et al.* (2007) 'Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- b -lactamases', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (2), pp. 321–322.
9. Ferreira, A. E. *et al.* (2011) 'Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil', *Microbial Drug Resistance*, 17(2), pp. 221-7.
10. Harding, C. M., Hennon, S. W. and Feldman, M. F. (2017) 'Uncovering the mechanisms of

Acinetobacter baumannii virulence', *Nature reviews,16* (2), pp. 91-102.

11. Higgins, P. G. *et al.* (2007) 'A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 13(12), pp. 1199–1201.
12. Higgins, P. G. *et al.* (2010) 'gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), pp. 4592–4594.
13. Hunter, S. B. *et al.* (2005) 'Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols : Converting the National Databases to the New Size Standard', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), pp. 1045–1050.
14. Kanafani, Z. A. and Kanj, S. S. (2018) '*Acinetobacter* infection: Treatment and prevention', *Up to Date*, pp. 1–19.
15. Lee, C. *et al.* (2017) 'Biology of *Acinetobacter baumannii* : Pathogenesis , Antibiotic Resistance Mechanisms , and Prospective Treatment Options', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, pp. 7-55.
16. Li, X. M. *et al.* (2016) 'Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species', *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46(3), pp. 270–278.
17. Martins, A. F. and Barth, A. L. (2013) '*Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública', *Scientia Medica*, 23(51), pp. 56–62.
18. Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. (2008) '*Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 538–582.
19. Reyes, R. R. *et al.* (2017) 'Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal , multidrug- resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico', *Plos one*, pp. 1–16.
20. Rios, V. M. and Almeida, M. T. G. de (no date) 'Carbapenemases: um problema em evolução'.
21. Rocha, L. *et al.* (2017) 'Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil : susceptibility profile and diversity of oxacillinases' *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 53

(6), pp. 358–361.

22. Rodríguez, C. H., Nastro, M. and Famiglietti, A. (2018) 'Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* . Review of their dissemination in Latin America', *Revista Argentina de Microbiología,* 50 (3), pp. 327-33.
23. Segal, H., Garny, S. and Elisha, B. G. (2005) 'Is IS ABA - 1 customized for *Acinetobacter* ?', *FEMS microbiology letters*, 243, pp. 425–429.
24. Singh, H., Thangaraj, P. and Chakrabarti, A. (2013) '*Acinetobacter baumannii* : A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management', *Journal of clinical and diagnostic research*, 7(11), pp. 2602–2605.
25. Teixeira, A. B. *et al.* (2016) 'PCR Assay Based on the gyr B Gene for Rapid Identification of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex at Specie Level', *Jornal of clinical laboratory analysis*, 4(April), pp. 1–4.
26. Turton, J. F. *et al.* (2006) 'Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the bla OXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species', *Jounal of clinical microbiology*, 44(8), pp. 2974–2976.
27. Vieira, P. B. and Picoli, S. U. (2015) '*Acinetobacter baumannii* multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos', *Revista brasileira de ciências da saúde*, 19, pp. 151–156.
28. Wang, J. *et al.* (2014) 'Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques', *Plos one*, 9(8), pp. 1–7.
29. Woodford, N. *et al.* (2006) 'Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp .', *International journal of antimicrobial agents*, 27, pp. 351–353.

5 Conclusões gerais

Através deste estudo, foi possível observar 100% de *A. baumannii* dentre os isolados coletados em hospital localizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Todos os isolados foram confirmados como multidroga-resistentes e apresentaram resistência aos cinco antibacterianos pertencentes a classe das cefalosporinas. Um total de 27,3% dos isolados apresentaram resistência a todos os antibióticos testados e 77,3% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico de cada classe, evidenciando a elevada taxa de resistência e a crescente limitação em termos de intervenção medicamentosa. A resistência aos carbapenêmicos foi observada em 95,4% dos isolados e a presença de metalo-β-lactamases foi identificada em 90,9%, ressaltando a elevada incidência de cepas CRAb em ambientes hospitalares. A análise dos perfis genéticos evidenciou a capacidade de disseminação desses patógenos entre setores hospitalares, salientando a necessidade de melhores cuidados de higiene e desinfecção de objetos e equipamentos a fim de evitar a contaminação cruzada. Além disso, isolados geneticamente semelhantes apresentaram diferentes perfis de resistência, evidenciando a capacidade de aquisição de mecanismos de resistência como alternativa de adaptação desses patógenos em ambientes com elevada administração de antibacterianos. A persistência de isolados de *A. baumannii* por longos períodos de tempo também foi observada, onde isolados pertencente ao mesmo clone foram coletados em um intervalo de dois anos, evidenciando a dificuldade de eliminação desses patógenos, mesmo em ambientes com elevados cuidados de higiene e desinfecção. Sendo assim, nossos resultados reafirmam a necessidade de maiores medidas de controle e desinfecção dentro do ambiente hospitalar, bem como evidencia a prioridade no desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para conter a propagação desses microrganismos.

Referências

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. et al. Molecular Mechanisms Associated with Nosocomial Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. **Archives of medical research**, v. 45, n.7, p. 553–60, 2014.

ALI, H. M. et al. Investigation of the Virulence Factors and Molecular Characterization of the Clonal Relations of Multidrug- Resistant. **Journal of AOAC international**, n. 2, p. 152-58, 2017.

ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens : Epidemiology and Resistance Features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586–96, 2018.

BABAPOUR, E. et al. Biofilm Formation in Clinical Isolates of Nosocomial *Acinetobacter baumannii* and Its Relationship with Multidrug Resistance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 6, p.528–33, 2016.

BAKOUR, S. et al. Emergence of Colistin- and Carbapenem- Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria. **Microbial drug resistance**, v. 21, n. 3, p. 1–7, 2014.

BIALVAEI, A. Z. et al. Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Iran : A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 6, p. 327-37, 2017.

CAMP, C.; TATUM, O. L. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 11, p. 649–57, 2010.

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

CHEN, T. L. et al. Rapid Identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a Multiplex PCR Assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63 (part 9), p. 1154–59, 2014.

EHRENSTEIN, B. et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n.10, p. 2414-20, 1996.

GOERING, R. V. Pulsed Field Gel Electrophoresis : A Review of Application and Interpretation in the Molecular Epidemiology of Infectious Disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866–75, 2010.

HARDING, C. M.; HENNON, S.W.; FELDMAN, M .F. Uncovering the Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* Virulence. **Nature Reviews**, v. 16, n. 2, p.91-102, 2017.

HIGGINS, P. G. et al. A PCR-Based Method to Differentiate between *Acinetobacter Baumannii* and *Acinetobacter* Genomic Species 13TU. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1199–1201, 2007.

HIGGINS, P. G. et al. gyrB Multiplex PCR to Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4592–94, 2010.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii* : Pathogenesis , Antibiotic Resistance Mechanisms , and Prospective Treatment Options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2017.

LEE, M. J. et al. Comparison of rpoB Gene Sequencing , 16S rRNA Gene Sequencing , gyrB Multiplex PCR , and the VITEK2 System for Identification of *Acinetobacter* Clinical Isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, 2013.

LI, X. M. et al. Development and Evaluation of Species-Specific PCR for Detection of Nine *Acinetobacter* Species. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 46, n. 3, p.270–78, 2016.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* Multirresistente – Um Desafio Para a Saúde Pública. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p.56, 2013.

PARVIZ, M. FARAHANI, A.; MEHRABZADEH, R. S. Molecular Characterization of Multidrug Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Units in West of Iran. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 11, n. 2, p. 20–22, 2017.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 21, n. 3, p. 538–82, 2008.

RIOS, V. M.; ALMEIDA, M. T. G. Carbapenemases: Um Problema Em Evolução. n.d.

RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* - Review of Their Dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 3, p. 327-33, 2018.

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B. G. Is ISABA - 1 Customized for *Acinetobacter* ?. **FEMS microbiology letters**, v. 243, n. 2, p.425–29, 2005.

SINGH, H.; THANGARAJ, P.; CHAKRABARTI, A. *Acinetobacter baumannii* : A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 7, n. 11, p. 2602–5, 2013.

TEIXEIRA, A. B. et al. PCR Assay Based on the Gyr B Gene for Rapid Identication of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex at Specie Level. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 31, n. 3, 2017.

TURTON, J. F. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the Bla OXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974–76, 2006.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista brasileira de ciências da saúde**, v.19, n. 2, p. 151–56, 2015.

WANG, J. et al. Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques. **Plos one**, v. 9, n. 8, p. 1–7, 2014.