

Investigação de genes de resistência aos aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* em um hospital de Recife - PE

Investigation of aminoglycoside resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter spp.* in a hospital in Recife - PE

Investigación de genes de resistencia a aminoglucósidos en aislados clínicos de *Acinetobacter spp.* en un hospital de Recife - PE

Recebido: 13/09/2021 | Revisado: 20/09/2021 | Aceito: 28/09/2021 | Publicado: 30/09/2021

Aline Mirely Sousa Albuquerque

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4570-6309>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: alinemrl92@gmail.com

Jailton Lobo da Costa Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5500-1129>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: jailtonlobo@hotmail.com

José Luciano Brainer de Farias Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8252-0936>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: brainerluciano@gmail.com

Adriana Maria Costa Marques da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0726-3527>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: adrianamarques87@hotmail.com

Maria Amélia Vieira Maciel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4220-6889>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: amelia57@gmail.com

Resumo

Os aminoglicosídeos são uma das opções terapêuticas empregadas no tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes, incluindo cepas de *Acinetobacter baumannii*. Esta espécie bacteriana é considerada como patógeno oportunista que consegue desenvolver resistência aos aminoglicosídeos através da degradação enzimática pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e metilases 16S RNAr. O presente estudo avaliou em isolados clínicos de *Acinetobacter spp* resistentes aos aminoglicosídeos, provenientes de um hospital de Recife-PE, a ocorrência de AMEs e metilases, além de avaliar a relação clonal entre os isolados. Foram investigadas as AMEs (*aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia*) e as metilases (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*) em 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes a um ou mais aminoglicosídeos, e foi realizada a ERIC-PCR para determinação da relação clonal. Dos três genes de AMEs estudados, o *ant(3'')-Ia* foi o gene mais prevalente presente em 43% (15/35) dos isolados, seguido por *ant(2'')-Ia* com menos de 1% (3/35), e o gene *aac(6')-Ib* não foi detectado. Entre as metilases, *armA* e *rmtC* foram os genes mais prevalentes, com 80% (28/35) e 57% (20/35), respectivamente. Os genes *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* não foram detectados. A tipagem molecular demonstrou uma ocorrência de dois clones no hospital. Os dados obtidos descrevem um avanço da resistência aos aminoglicosídeos, a ocorrência dos genes detectados com padrão similar a outros estudos prévios, uma relação de clonalidade entre os isolados de *Acinetobacter spp* que demonstram diversidade no ambiente hospitalar e a necessidade de métodos de prevenção a disseminação destes clones em hospitais de Recife, Pernambuco.

Palavras-chave: *Acinetobacter spp*; Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; Metilases.

Abstract

Aminoglycosides are one of the therapeutic options used in the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli, including *Acinetobacter baumannii* strains. These bacterial species are considered an opportunistic pathogen that manage to develop resistance to aminoglycosides through enzymatic degradation by aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) and 16S rRNA methylases. This study evaluated the occurrence of AMEs and methylases in a clinic isolates for aminoglycoside-resistant *Acinetobacter spp* from a hospital in Recife-PE, in addition to evaluating the clonal relationship among those compared. They were investigated as AMEs (*aac*

(6')-Ib, ant (2'')-Ia and ant (3'')- Ia) and as methylases (armA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtF, rmtG) in 35 from *Acinetobacter spp.* resistant to one or more aminoglycosides, and ERIC-PCR was performed to determine the clonal relationship. Of the three AME genes studied, ant (3'')-Ia was the most prevalent gene present in 43% (15/35) of the following, followed by ant (2'')-Ia with less than 1% (3 / 35), and the aac (6')-Ib gene was not detected. Among the methylases, armA and rmtC were the most prevalent genes, with 80% (28/35) and 57% (20/35), respectively. The rmtB, rmtD, rmtF and rmtG genes were not detected. Molecular typing by ERIC-PCR described the occurrence of two clones in the hospital. The data obtained described an advance in resistance to aminoglycosides and the occurrence of genes detected with pattern similar to other previous studies, a clonality relationship among *Acinetobacter spp.* isolates that demonstrate diversity in the hospital environment and the necessity for methods to prevention of dissemination of these clones in hospitals of Recife, Pernambuco.

Keywords: *Acinetobacter spp.*; Aminoglycoside modifying enzymes; Methylases.

Resumen

Los aminoglucósidos son una de las opciones terapéuticas utilizadas en el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gramnegativos multirresistentes, incluidas las cepas de *Acinetobacter baumannii*. Esta especie bacteriana es considerada un patógeno oportunista que logra desarrollar resistencia a los aminoglucósidos a través de la degradación enzimática por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) y metilases de rRNA 16S. El presente estudio evaluó en aislados clínicos de *Acinetobacter spp.* resistentes a aminoglucósidos de un hospital de Recife-PE, la ocurrencia de AME y metilases, además de evaluar la relación clonal entre los aislados. Se investigaron AME (aac (6') - Ib, hormiga (2'') - Ia y hormiga (3'') - Ia) y metilases (armA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtF, rmtG) en 35 aislamientos de *Acinetobacter spp.* resistentes a uno o más aminoglucósidos, y se realizó ERIC-PCR para determinar la relación clonal. De los tres genes AME estudiados, ant (3'') - Ia fue el gen más prevalente presente en el 43% (15/35) de los aislamientos, seguido de ant (2'') - Ia con menos del 1% (3/35) y no se detectó el gen aac (6') - Ib. Entre las metilases, armA y rmtC fueron los genes más prevalentes, con 80% (28/35) y 57% (20/35), respectivamente. No se detectaron los genes rmtB, rmtD, rmtF y rmtG. La tipificación molecular demostró la aparición de dos clones en el hospital. Los datos obtenidos describen un avance en la resistencia a los aminoglucósidos, la ocurrencia de genes detectados con un patrón similar a otros estudios previos, una relación de clonalidad entre aislamientos de *Acinetobacter spp.* que demuestran diversidad en el ambiente hospitalario y la necesidad de métodos para prevenir la propagación de estos clones. en hospitales de Recife, Pernambuco.

Palabras clave: *Acinetobacter spp.*; Enzimas modificadoras de aminoglucósidos; Metilases.

1. Introdução

Acinetobacter spp. são patógenos associados a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), incluindo pneumonia, sepses, infecções de pele e tecidos moles, trato urinário e infecções de feridas. A espécie mais comumente associada a essas infecções é o *Acinetobacter baumannii*. A infecção por este microrganismo geralmente ocorre em pacientes que fazem uso de ventilação mecânica, em feridas cirúrgicas, traumas graves, queimaduras, e os fatores que contribuem para sua aquisição são a internação prévia, tempo de internação prolongada, uso de cateteres e uso prévio de antibióticos (Almasaudi, 2018).

Para a terapêutica infecciosa de *A. baumannii*, utiliza-se classes de antimicrobianos como carbapenêmicos, polipeptídicos (polimixina) e gliciliclinas (tigeciclina), mas as estratégias de tratamento atuais estão limitadas devido a propensão a desenvolver resistência (Lee et al, 2017). Devido a isto, optam-se por utilizar uma terapia combinada, incluindo dois ou três diferentes classes de antimicrobianos, onde assim obtém-se um amplo espectro de cobertura e um efeito sinérgico contra o patógeno (Lee et al, 2017). Os aminoglicosídeos são antimicrobianos utilizados na terapêutica antimicrobiana em infecções causadas por bacilos aeróbicos gram-negativos, como *A. baumannii* (Serio et al, 2018). São fármacos de amplo espectro, disponível em diferentes formulações, utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, respiratório, sepse, pneumonia e infecções de pele (Krause et al, 2016).

Acinetobacter spp. vem adquirindo resistência aos antimicrobianos rapidamente, através de vários mecanismos como degradação enzimática de antimicrobianos, modificação de sítio alvos, bombas de efluxo e alterações da permeabilidade. A degradação enzimática aos aminoglicosídeos ocorre através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e metilases de 16S RNAr (Shin, 2017).

A inativação enzimática é a forma de resistência mais comum aos aminoglicosídeos. As AMEs atuam catalisando uma modificação nos grupos químicos --OH ou -NH₂ do núcleo da 2-desoxitreptamina ou porções açúcares dos fármacos aminoglicosídeos, impedindo que o fármaco se ligue às subunidades dos ribossomos, estas podem ser classificadas em três classes: acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT) (Labby, 2013). Por outro lado, as metilases 16S RNAr acarretam resistência aos aminoglicosídeos através da modificação de resíduos específicos de nucleotídeos de RNAr, bloqueando os aminoglicosídeos de se ligar ao seu alvo. Elas atuam por meio da metilação de um nucleotídeo no sítio de ligação do aminoglicosídeo do rRNA 16S (Doi, 2016).

Acinetobacter spp. codificam uma diversidade de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Liu et al (2015) ao analisar 60 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes à amicacina, observaram uma prevalência de 66,7 % relacionada ao gene *armA* (metilase 16S RNAr), enquanto outras metilases 16S RNAr como *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* e *npmA* não foram detectadas, entre as AMEs, foram detectadas mais frequentemente os genes *aac(6')-Ib*, *ant-(3'')-Ia* e *aph(3')-I*.

No Brasil, um estudo analisou a presença de genes metilases 16S RNAr (*rmtD* e *rmtG*) e AMEs (*aacA4*, *aacA1*, *aacC1*, *aphA6*, *aphA7*, *aph(3')-Iib*, *aadB*, *aadA1*, *addA2*, *aadA6*, *aadA7*, *strA* e *strB*) em isolados de bactérias gram-negativas, incluindo não fermentadores como *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* em três estados no período de 2007 a 2014, descrevendo nos isolados de *A. baumannii* apenas genes AMEs, como *aacA4*, *aacC1*, *aphA7*, *aadB*, *aadA1*, *aphA6*, e não detectou *rmtD* e *rmtG*. O *rmtD* foi detectado apenas em *P. aeruginosa*, e *rmtG* em *Klebsiella pneumoniae* (Ballaben et al, 2018).

Em relação as metilases, o primeiro relato de *rmtC* em *A. baumannii* foi publicado por Bado e colaboradores (2018), em dois isolados provenientes de uma Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário do Uruguai. Posteriormente, no estado de Pernambuco, Brasil, Da Paz Pereira et al (2020) avaliaram isolados provenientes de um hospital oncológico, onde foram detectados a presença dos genes metilases 16S RNAr: *armA*, *rmtB* e *rmtC*, sendo este estudo o primeiro relato do gene *rmtC* em isolados de *A. baumannii* no Brasil.

Diante disto, este presente estudo avaliou o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e investigou a presença de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: acetiltransferases *aac(6')-Ib* e nucleotidiltransferases *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia*; e a presença dos genes metilases 16S RNAr: *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*, provenientes de um hospital terciário de Recife-PE e o seu perfil clonal.

2. Metodologia

Isolados bacterianos

Foram selecionados 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes a um ou mais aminoglicosídeos (gentamicina e/ou amicacina), provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados em 2018. Os isolados foram mantidos congelados em estoque com glicerol a -20°C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular. Para as análises, as bactérias foram reativadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, semeadas em meio Luria Bertani (LB) e colocadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os isolados bacterianos analisados neste trabalho foram provenientes de projeto que foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde número CAAE 0490.0.172.000-11.

Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo LB a 37°C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total dos isolados clínicos. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido

pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm.

PCR dos genes que codificam as AMES

Os genes *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia* foram investigados pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na Tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 2µl de DNA genômico a 10 ng/µl, 8 mM de dNTP (0,6 µL), 5x tampão (5 µL), 25 mM de MgCl₂ (2,0 µL) e 5 U de Taq DNA polimerase (0,2 µL) e 2 µL de cada primer a 10pmol. Foi adicionado um controle negativo em cada reação, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA; e um controle positivo no gene *aac(6')-Ib* que foi cedido por Firmo et al (2020), e os resultados do *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia* que não continha controle positivo, foram confirmados por sequenciamento. As amplificações foram realizadas no termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, com cada ciclo de 30 segundos à 94°C para desnaturação, anelamento por 30 segundos à 55°C para o *ant(2'')-Ia*, 49°C para o *ant(3'')-Ia* e 45°C para *aac(6')-Ib* e 1 minuto à 72°C para alongamento. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5x. Posteriormente foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

PCR dos genes que codificam metilases

Os genes *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* foram investigados pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na Tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10 ng/µl, 8 mM de dNTP (0,6 µL), 5x tampão (5 µL), 25 mM de MgCl₂ (2,0 µL) e 5 U de Taq DNA polimerase (0,2 µL) e 1 µL de cada primer a 10pmol. Foi adicionado um controle negativo em cada reação, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo. As amplificações foram realizadas no termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, com cada ciclo de 30 segundos à 94°C para desnaturação, 30 segundos à 52°C para anelamento do *armA* e *rmtC*, 55°C para *rmtG*, 54° para *rmtF*, e 51°C para *rmtB* e *rmtD*, e 30 segundos à 72°C para alongamento. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Posteriormente foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Tabela 1: Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores das AMEs e metilases.

Genes	Sequência do primer	Fragmento (pb)	Referências
aac(6')-Ib	5'-CAAAGTTAGGCATCACA-3' 5'-ACCTGTACAGGATGGAC-3'	540	Miró et al, 2013
ant(2')-Ia	5'-ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGT-3' 5'-CTTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG-3'	572	Miró et al, 2013
ant(3')-Ia	5'-TCGACTCAACTATCAGAGG-3' 5'-ACAATCGTGACTTCTACAGCG-3'	245	Miró et al, 2013
armA	5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3' 5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3'	101	Berçot, 2011
rmtB	5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3' 5'-AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3'	171	Berçot, 2011
rmtC	5'-CAGGGGTTCCAACAAGT-3' 5'-AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3'	246	Berçot, 2011
rmtD	5'-GGAAAAGGACGTGGACA-3' 5'-TCCATCGATTCCACAGG-3'	171	Berçot, 2011
rmtF	5'-GCGATACAGAAAACCGAAGG-3' 5'-ACCAGTCGGCATAGTGCTTT-3'	589	Hidalgo et al, 2013
rmtG	5'-AAATACAGCGATGTGTGTCC-3' 5'-ACACGGCATCTGTTTCTTCC-3'	250	Bueno et al, 2013

Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR).
Fonte: Autores.

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'- AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com Blue-green e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (Duan et al., 2009).

Sequenciamento genético

Foram realizados o sequenciamento de dois genes que não continham controle positivo, o *ant(2)-Ia* e o *ant(3)-Ia* para confirmação dos genes identificados. O produto da PCR foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente purificado através do kit de purificação de DNA Wizard (SV gel e PCR clean-up System) (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação o fragmento de DNA foi levado ao sequenciamento. Este apresentou resultado satisfatório e as sequências de nucleotídeos foram confrontadas com as sequências disponíveis em bancos de dados, usando os algoritmos BlastN e BlastX BlastNetwork disponíveis no NCBI. As sequências foram depositadas com código de acesso: MZ322621 (para o *ant(2)-Ia*) e MZ322622 (para o *ant(3)-Ia*).

3. Resultados

Os 35 isolados de *Acinetobacter spp.* foram obtidos de diferentes amostras clínicas, sendo os provenientes de secreção traqueal e sangue com maior frequência, correspondendo a 48,6% (17/35) e 28,6% (10/35), respectivamente. A maioria dos isolados foram obtidos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), representando a 54,3% (19/35) do total, seguidos por Unidade Coronariana (UCO1) com 20% (7/35), Emergência Geral (EGI) com 14,3% (5/35); e UCO2, Cardiologia, Clínica cirúrgica e Clínica Vascular com 2,8% (1/35) cada.

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos, todos os 35 (100%) isolados selecionados foram resistentes a gentamicina, 83% (29/35) resistentes a amicacina, 14% (5/35) foram considerados com perfil intermediário para amicacina e apenas 3% (1/35) foi sensível a amicacina.

Dos três genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) estudados, apenas as nucleotidiltransferases foram encontradas entre os isolados, distribuídos entre 48% (17/35) dos isolados. O *ant(3')-Ia* foi o gene mais prevalente, encontrado em 43% (15/35) dos isolados, seguido por *ant(2)-Ia* com menos de 1%, detectado em apenas três isolados. O gene *aac(6')-Ib* não foi detectado em nenhum isolados. E apenas um isolado, o A19, apresentou dois genes simultaneamente, o *ant(2)-Ia* e o *ant(3)-Ia* (tabela 2).

Entre os genes que codificam as metilases, *armA* e *rmtC* foram os mais encontrados, representando 80% (28/35) e 57% (20/35) dos isolados, respectivamente. E os genes *rmB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* não foram encontrados em nenhum dos isolados estudados. Entre os isolados carreadores de metilases, 34% (12/35) apresentaram apenas um gene, 51% (18/35) apresentaram dois genes simultaneamente, ocorrendo a associação entre os genes *armA* e *rmtC*. Na maioria dos isolados também foram detectados uma associação entre AMES e metilases (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição de genes de resistência de AMEs e metilases, seus respectivos fenótipos de perfil de suscetibilidade.

Genes	Número de isolados (%)	Resistente a gentamicina	Resistente a amicacina
<i>armA</i>	28 (80%)	28/28 (100%)	22/28 (79%)
<i>rmtC</i>	20 (57%)	20/20 (100%)	21/28 (75%)
<i>ant(2)-Ia</i>	3 (9%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
<i>ant(3)-Ia</i>	15 (43%)	15/15 (100%)	10/15 (66%)
<i>armA</i> + <i>rmtC</i>	18 (51%)	18/18 (100%)	13/18 (72%)
<i>armA</i> + <i>ant(3)-Ia</i>	13 (37%)	13/13 (100%)	8/13 (61%)
<i>armA</i> + <i>ant(2)-Ia</i>	3 (9%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
<i>rmtC</i> + <i>ant(2)-Ia</i>	3 (9%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
<i>rmtC</i> + <i>ant(3)-Ia</i>	10 (29%)	10/10 (100%)	6/10 (60%)
<i>armA</i> + <i>rmtC</i> + <i>ant(3)-Ia</i>	9 (26%)	9/9 (100%)	5/9 (55%)
<i>armA</i> + <i>rmtC</i> + <i>ant(2)-Ia</i>	3 (9%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
<i>armA</i> + <i>rmtC</i> + <i>ant(2)-Ia</i> + <i>ant(3)-Ia</i>	1 (3%)	1/1 (100%)	0

Fonte: Autores.

A análise da ERIC-PCR dos isolados de *Acinetobacter spp.* demonstrou uma ampla diversidade clonal entre os isolados analisados, havendo a presença de dois clones mais prevalentes no hospital, os clones C1 e C2, apresentando 100% de similaridade genética entre eles. O clone denominado C1 foi composto pelos isolados A32, A88 e A92 e os isolados A33, A47 e A48 sendo denominado C2. O perfil clonal C1 foi encontrado em isolados clínicos de pacientes internos na UTI e UCO1, e o perfil C2 em pacientes internados na UTI, Clínica Cirúrgica e UCO1. A região de coleta dos isolados clínicos pertencentes ao clone C1 foram secreção traqueal e sangue, e as do clone C2 foram sangue, secreção biliar e secreção traqueal (Figura 1).

4. Discussão

A frequência da resistência dos isolados bacterianos no presente trabalho aos aminoglicosídeos foi 100% à gentamicina e em relação à amicacina de 83%. Leal et al (2020) e Da Paz Pereira et al (2020) descreveram frequências em média de 50% de resistência a estes fármacos em hospitais localizados na mesma cidade do presente estudo demonstrando que o perfil de resistência a estes fármacos está avançando em Recife, Pernambuco.

Estes índices de resistência variam no Brasil, Castilho et al (2017), de 57,1% à gentamicina e 21,4% à amicacina em Goiânia, Brasil. por outro lado, índices de 76% e 32% respectivamente à gentamicina e amicacina foram descritos em São José Rio Petro, São Paulo, Brasil (Polotto et al 2020). Dados descritos no Amazonas (Ribeiro et al 2021), descrevem dados semelhantes ao presente trabalho em relação à gentamicina, mas também uma frequência de 100% de resistência para amicacina, semelhantes aos nossos resultados foram descritos por Jouybari et al (2021), no Iran.

Semelhante a este estudo, um estudo realizado no Irã (Salimizand et al, 2018) analisou a distribuição de AMEs e metilases 16S RNAr em *A. baumannii* e *Acinetobacter nosocomialis*, onde foram detectados predominantemente o *armA*, representando 41,6% em *A. baumannii* e 67,4% em *A. nosocomialis*; e não foram detectados *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*; diferindo deste estudo em relação ao *rmtC*, onde foi constatado uma prevalência deste gene. Em relação as AMEs, o *ant(3)-Ia* foi o gene mais frequente, representando 74,1% em *A. baumannii* e 86% em *A. nosocomialis*, corroborando os nossos achados.

A prevalência do gene *rmtC* neste estudo demonstra a recente descoberta e disseminação deste gene em isolados de *Acinetobacter spp* na América do Sul. Em 2018, Bado et al publicaram o primeiro relato do gene *rmtC* em *A. baumannii* no Uruguai, identificado em uma Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário. Posteriormente em 2020, Da Paz Pereira publicou o primeiro relato do gene *rmtC* em *A. baumannii* no Brasil proveniente de um hospital oncológico de Recife-PE, sendo recente o aparecimento de *rmtC* nesta espécie aqui no país, como também detectou o gene *armA* em todos os seus isolados.

Similarmente a este estudo, na China (Liu et al, 2015) também foram detectados alta prevalência do gene *armA* entre isolados de *A. baumannii*, totalizando 66,7% dos isolados, porém não obteve nenhum isolado com a presença do gene *rmtC*, como também os genes *rmtB* e *rmtD* não foram detectados. Entre os genes das AMEs, teve maior prevalência os genes *aac(6')-Ib* (51,7%) e *ant(3'')-Ia* (81,7%), diferindo deste estudo, onde o gene *aac(6')-Ib* não foi detectado em nenhum dos isolados.

Poucos são os relatos da ocorrência dos genes *ant(2')-Ia* ou *ant(3')-Ia* em isolados de *Acinetobacter spp.* no Brasil. Ballaben et al (2018) ao avaliar a resistência a aminoglicosídeos de alto nível em bacilos gram-negativos não fermentadores, detectou em um isolado de *A. baumannii* a presença dos genes *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia* juntamente com outras AMEs. Entretanto, Polotto (2020) ao pesquisar AMEs em isolados de *A. baumannii* provenientes de um hospital público de São José de Rio Preto, não detectou o gene *ant(2'')-Ia*, porém o *aac(6')-Ib* foi o segundo gene mais prevalente e o *ant(3')-Ia* não foi pesquisado.

Os dados genéticos da ERIC-PCR neste estudo descreveram uma ampla diversidade clonal entre os isolados analisados, havendo a presença de dois clones mais prevalentes no hospital, os clones C1 e C2, presentes de pacientes internados na UTI, UCO1 e Clínica cirúrgica, este padrão clonal foi similar aos dados de Ece et al (2015). Resultados

similares também foram detectados por Araújo Lima et al (2020), ao analisar isolados de *A. baumannii* provenientes de dois hospitais públicos de Recife-PE, onde a ERIC-PCR revelou cinco clones mais prevalentes, indicando dispersão clonal entre setores diferentes do mesmo hospital. Leal et al (2020) descreve a dispersão entre múltiplos clones em seis hospitais públicos na mesma cidade.

Dados relacionados a dispersão clonal deste patógeno entre isolados de colonização são descritos em estudo realizado com isolados provenientes de amostras de swab retal e ponta de cateter de *A. baumannii* em neonatos internados em UTI Neonatal descrevendo a ocorrência de clone dominante apenas sensível ao fármaco polimixina B (Maciel et al, 2018).

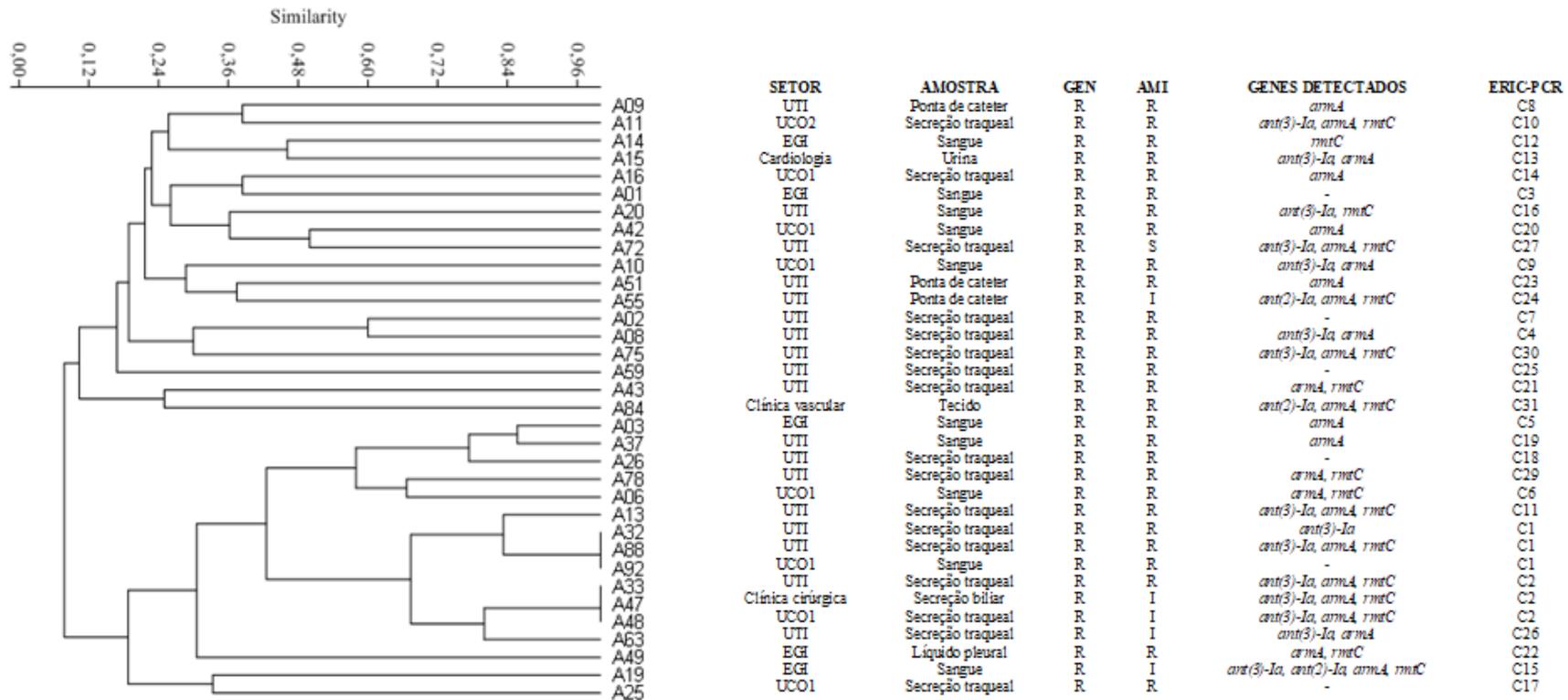
Por outro lado, durante a atual pandemia de Covid-19 através da ERIC-PCR, foi demonstrado um surto de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos em UTI em um hospital no Paraná, Brasil relacionado a apenas um clone em isolados de infecção e colonização (Shinohara et al, 2021). Estudo semelhante foi realizado por Tawfik et al (2020), onde foi analisado a diversidade genotípica dos isolados de *A. baumannii* carreando enzimas modificadoras de aminoglicosídeos mediada por plasmídeo, através da ERIC-PCR. Entretanto, os resultados demonstraram uma heterogeneidade molecular significativa que indicou que não havia disseminação clonal entre pacientes de UTI.

Em relação as linhagens bacterianas que foram analisadas pela ERIC-PCR, o padrão nos clones não necessariamente apresentou a ocorrência dos genes de resistência aos aminoglicosídeos (AMEs e metilases) semelhante a outros trabalhos de El-Badawy et al (2019), o padrão genético não é similar entre os clones, podendo ser atribuído ao processo de transmissão horizontal genética entre a bactéria e a pressão seletiva hospitalar. Diante disto, os dados sobre a relação de clonalidade entre os isolados de *Acinetobacter* spp demonstram sua ocorrência e diversidade no ambiente hospitalar e a necessidade de métodos de prevenção a disseminação destes clones.

5. Considerações Finais

A maioria dos estudos realizados no Brasil relacionados ao *A. baumannii* focam em realizar análises voltadas a descrever a ocorrência das enzimas carbapenemases do tipo OXA e metalo- β -lactamases conferindo resistência aos beta-lactâmicos, reduzindo assim as opções terapêuticas a este patógeno (Kurihara et al, 2020). Cabe ressaltar que na ocorrência de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos os aminoglicosídeos são as opções de escolha para ser empregada em terapia combinada na terapia desses patógenos, porém a ocorrência de resistência a estas drogas tem se tornado crescente, por esta razão sugerimos que a coleta de dados fenotípicos e genéticos relacionados aos aminoglicosídeos no Brasil sejam mais investigados, assim como ocorrem quando comparamos ao perfil de resistência aos carbapenêmicos.

Figura 1: Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* de um hospital público de Recife-PE, Brasil. O dendrograma mostra o coeficiente de similaridade das amostras e a identificação dos devidos isolados.



AMI: amicacina; EGI: emergência geral; GEN: gentamicina; UTI: unidade terapia intensiva; UCO: Unidade Coronariana. S: sensível, I: intermediário, R: resistente.
 Fonte: Autores.

Referências

- Almasaudi, S. B. (2018). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 586-596.
- Araujo Lima, A. V., da Silva, S. M., do Nascimento Júnior, J. A. A., Correia, M. D. S., Luz, A. C., Leal-Balbino, T. C., ... & Paiva, P. M. G. (2020). Occurrence and diversity of intra-and interhospital drug-resistant and biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 26(7), 802-814.
- Bado, I., Papa-Ezdra, R., Delgado-Blas, J. F., Gaudio, M., Gutiérrez, C., Cordeiro, N. F., ... & Vignoli, R. (2018). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit of Uruguay's University Hospital identifies the first *rmtC* gene in the species. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 1012-1019.
- Ballaben, A. S., Andrade, L. N., Galetti, R., Ferreira, J. C., McElheny, C. L., Mettus, R. T., ... & Doi, Y. (2018). Diversity of high-level aminoglycoside resistance mechanisms among Gram-negative nosocomial pathogens in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(11), e01550-18.
- Berçot, B., Poirer, L., & Nordmann, P. (2011). Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 71(4), 442-445.
- Bueno, M. F. C., Francisco, G. R., O'Hara, J. A., de Oliveira Garcia, D., & Doi, Y. (2013). Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2397-2400.
- Castilho, S. R. A., Godoy, C. S. D. M., Guilarde, A. O., Cardoso, J. L., André, M. C. P., Junqueira-Kipnis, A. P., & Kipnis, A. (2017). *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS One*, 12(5), e0176790.
- Paz Pereira, J. N., de Andrade, C. A. D. N., da Costa Lima, J. L., de Lima Neto, R. G., de Araújo, P. S. R., & Maciel, M. A. V. (2020). Clonal dissemination of clinical isolates of *acinetobacter baumannii* carriers of 16S rRNA methylase genes in an oncological hospital in Recife, Brazil. *Current microbiology*, 77(1), 32-39.
- Doi, Y., Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics*, 30(2), 523-537.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., ... & Schlenker, G. (2009). Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental research*, 109(5), 511-517.
- Ece, G., Erac, B., Cetin, H. Y., Ece, C., & Baysak, A. (2015). Antimicrobial susceptibility and clonal relation between *Acinetobacter baumannii* strains at a Tertiary Care Center in Turkey. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2).
- El-Badawy, M. F., Abdelwahab, S. F., Alghamdi, S. A., & Shohayeb, M. M. (2019). Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia. *Infection and drug resistance*, 12, 3113.
- Firmo, E. F., Beltrão, E. M. B., da Silva, F. R. F., Alves, L. C., Brayner, F. A., Veras, D. L., & Lopes, A. C. S. (2020). Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 255-261.
- Hidalgo, L., Hopkins, K. L., Gutierrez, B., Ovejero, C. M., Shukla, S., Douthwaite, S., ... & Gonzalez-Zorn, B. (2013). Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1543-1550.
- Jouybari, M. A., Ahanjan, M., Mirzaei, B., & Goli, H. R. (2021). Role of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylase (ArmA) in resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates against aminoglycosides. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029.
- Kurihara, M. N. L., Sales, R. O. D., Silva, K. E. D., Maciel, W. G., & Simionatto, S. (2020). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: A global problem in healthcare settings. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53.
- Labby, K. J., & Garneau-Tsodikova, S. (2013). Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. *Future medicinal chemistry*, 5(11), 1285-1309.
- Leal, N. C., Campos, T. L., Rezende, A. M., Docena, C., Mendes-Marques, C. L., de Sá Cavalcanti, F. L., ... & de-Melo-Neto, O. P. (2020). Comparative genomics of *Acinetobacter baumannii* clinical strains from Brazil reveals polyclonal dissemination and selective exchange of mobile genetic elements associated with resistance genes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1176.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., ... & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 55.
- Liu, Z., Ling, B., & Zhou, L. (2015). Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *Journal of Chemotherapy*, 27(4), 207-212.
- Maciel, W. G., da Silva, K. E., Croda, J., Cayo, R., Ramos, A. C., de Sales, R. O., ... & Simionatto, S. (2018). Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 98(3), 300-304.
- Miró, E., Grünbaum, F., Gómez, L., Rivera, A., Mirelis, B., Coll, P., & Navarro, F. (2013). Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microbial drug resistance*, 19(2), 94-99.

Polotto, M., Casella, T., Tolentino, F. M., Mataruco, M. M., Porto, N. K. M., Binhardi, M. F. B., & Nogueira, M. C. L. (2019). Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53.

Ribeiro, E. A., Gales, A. C., Oliveira, A. P. S. D., Coelho, D. D., Oliveira, R. A. D., Pfrimer, I. A. H., & Carmo, J. R. D. (2020). Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in the Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54.

Salimizand, H., Zomorodi, A. R., Mansury, D., Khakshoor, M., Azizi, O., Khodaparast, S., ... & Sadeghian, H. (2018). Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of *aadA1* and *armA*. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 195-199.

Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L., & Krause, K. M. (2018). Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. *EcoSal Plus*, 8(1).

Shin, B., & Park, W. (2017). Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. *Journal of Microbiology*, 55(11), 837-849.

Shinohara, D. R., dos Santos Saalfeld, S. M., Martinez, H. V., Altafini, D. D., Costa, B. B., Fedrigo, N. H., & Tognim, M. C. B. (2021). Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)-specific intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 1-3.

Tawfick, M. M., Rady, H. F., El-Borhamy, M. I., & Maraqa, A. D. (2020). Dissemination of Plasmid-Mediated Aminoglycoside-Modifying Enzymes Among MDR Isolates from a Tertiary Care Egyptian Hospital. *The Open Microbiology Journal*, 14(1).