



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
AMINOGLICOSÍDEOS MEDIADA POR METILASES RNAr 16S DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp. PROVENIENTES DE UM HOSPITAL
ONCOLÓGICO DO RECIFE**

**Recife
2018**

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
AMINOGLICOSÍDEOS MEDIADA POR METILASES RNA^r 16S DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp. PROVENIENTES DE UM HOSPITAL
ONCOLÓGICO DO RECIFE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

P436c

Pereira, Jussyêgles Niedja da Paz.

Caracterização fenotípica e molecular da resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife / Jussyêgles Niedja da Paz Pereira. – Recife: o autor, 2018.

79 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Acinetobacter*. 2. Aminoglicosídeos. 3. Genes. 4. Institutos de câncer. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 274)

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
AMINOGLICOSÍDEOS MEDIADA POR METILASES RNAr 16S DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp. PROVENIENTES DE UM HOSPITAL
ONCOLÓGICO DO RECIFE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 26/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Marcelle Aquino Rabelo (Examinadora Externa)
Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-PE)

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Nilma Cintra Leal (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Dedico este trabalho a Deus, por sempre me guiar e porque sem ele nada é possível e às pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos pais, Adilson Pereira e Sonia Maria, pelo amor, incentivo, pela presença tão especial em todos os momentos da minha vida e porque minhas conquistas também são deles.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, dando-me força e coragem permitindo a realização dos meus objetivos.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos pais, Adilson Pereira e Sonia Maria, verdadeiros anjos, dos quais sinto orgulho e representam o presente mais valioso e especial que Deus me deu, pelo amor, estímulo, amizade, atenção, apoio, sábios conselhos, paciência, compreensão, ensinamentos e orações dedicadas a mim.

Aos meus irmãos, pelo carinho e incentivo.

À professora Amélia Maciel, pela orientação, amizade, atenção, ensinamentos e confiança.

A Danilo Xavier, pela atenção e apoio.

A Carlos Alberto, pela atenção e ajuda, durante a realização da PFGE.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical, pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, pelo apoio e pelos momentos compartilhados.

A Walter Galdino, por estar sempre disposto a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado.

A todos que diretamente ou indiretamente, contribuíram para concretização deste trabalho.

“Amanhã, este amanhã que imaginamos de maneira tão inquieta, não nos pertence: está nas mãos de Deus, isto é, nas mãos do mais terno e compreensivo dos pais.”

L. Veillot

RESUMO

As metilases RNAr 16S geram alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, os quais são utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas, como o *Acinetobacter* spp. Alguns genes codificadores destas enzimas estão disseminados mundialmente, enquanto outros foram detectados em alguns países. Caracterizar o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, e dos resistentes a ambos antimicrobianos, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de amicacina, gentamicina e tobramicina e caracterizar os perfis genético (*armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*) e clonal. Foram selecionados isolados resistentes a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina, através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton. Foi realizada microdiluição em caldo para determinar as CIMs dos antimicrobianos amicacina, gentamicina e tobramicina para estes isolados. Os mesmos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* e à *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), para a determinação do perfil clonal. Entre 23 isolados analisados, 12 (52,2%) foram resistentes à amicacina e à gentamicina. Entre estes, 11 (91,7%), 12 (100%) e nove (75%) isolados apresentaram respectivamente, CIMs > 256 µg/mL de amicacina, > 64 µg/mL de gentamicina e > 64 µg/mL de tobramicina. O gene *armA* foi encontrado em todos os isolados 12 (100%) e em 6 (50%) houve a coexistência dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC*. O gene *rmtD* não foi detectado. O presente estudo é o primeiro relato do gene *rmtC* na América do Sul e representa também o primeiro relato dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no Brasil. Estes isolados apresentaram elevada similaridade genética (92%) e foram classificados como clone A. São fundamentais a elaboração e o cumprimento de medidas que evitem a disseminação do referido mecanismo de resistência, em virtude da maior restrição terapêutica, ocasionada por ele, no caso de infecções por bactérias gram-negativas multidroga resistentes (MDR). A realização de mais estudos também é importante, para a obtenção de dados locais referentes ao mesmo.

Palavras-chave: *Acinetobacter*. Aminoglicosídeos. Genes. Institutos de Câncer.

ABSTRACT

The 16S rRNA methylases generate a high level of resistance to aminoglycosides, which are used in the treatment of severe infections caused by gram-negative bacteria, such as *Acinetobacter* spp. Some genes encoding these enzymes are widespread worldwide, while others have been detected in some countries. To characterize the susceptibility profile to aminoglycosides (amikacin and gentamicin) of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from an oncological hospital in Recife and of resistant to both antimicrobials, determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of amikacin, gentamicin and tobramycin and to characterize the genetic (*armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD*) and clonal profiles. Isolates resistant to both antimicrobials, amikacin and gentamicin, were selected using the disk diffusion technique in Mueller-Hinton agar. Microdilution in broth was carried out to determine MICs of the antimicrobials amikacin, gentamicin and tobramycin for these isolates. They were submitted to the polymerase chain reaction (PCR), to detect the *armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD* genes and to the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), for the determination of the clonal profile. Among 23 isolates analyzed, 12 (52,2%) were resistant to amikacin and gentamicin. Among them, 11 (91,7%), 12 (100%) and nine (75%) isolates presented respectively MICs > 256 µg/mL of amikacin, > 64 µg/mL of gentamicin and > 64 µg/mL of tobramycin. The *armA* gene was found in all 12 isolates (100%) and in six (50%) there was coexistence of the *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes. The *rmtD* gene was not detected. The present study is the first report of the *rmtC* gene in South America and also represents the first report of the *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Brazil. These isolates had a high genetic similarity (92%) and were classified as clone A. It is fundamental to elaborate and comply with measures that prevent the dissemination of said mechanism of resistance, due to the greater therapeutical restriction caused by it, in case of multidrug-resistant (MDR) gram-negative bacteria infections. Further studies are also important to obtain local data.

Keywords: *Acinetobacter*. Aminoglycosides. Genes. Cancer Care Facilities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura tridimensional do sítio A do RNAr 16S ligado à gentamicina.....	24
Figura 2 - Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.	32
Figura 1 - Gel de agarose corado com brometo de etídio e padrões de PFGE dos isolados analisados.....	48
Figura 2 - Padrões de PFGE dos isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. resistentes à amicacina, gentamicina e tobramicina e portadores de genes de metilases RNAr 16S (<i>armA</i> , <i>rmtB</i> e <i>rmtC</i>).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos gerados pelas metilases RNAr 16S N7-G1405 e N1-A1408	25
Tabela 2 - Visão geral das metilases RNAr 16S N7-G1405 e N1-A1408.....	26
Tabela 3 - Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência mediada por metilases RNAr 16S.....	29
Tabela 4 - Caracterização dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. com resistência concomitante à amicacina e à gentamicina quanto ao setor hospitalar e à amostra de origem.....	31
Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.....	33
Tabela 1 - Caracterização dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. com resistência concomitante à amicacina e à gentamicina quanto ao valor da CIM e à ocorrência dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ArmA	<i>aminoglycoside resistance methyltransferase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAMHB	Caldo Mueller-Hinton ajustado com cátions
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial repetitive intergenics consensus-polimerase chain reaction</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LB	Luria Bertani
MBL	Metallo-beta-lactamase
MDR	Multidroga resistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
RmtB	<i>ribosomal methyltransferase B</i>

RmtC	<i>ribosomal methyltransferase C</i>
RmtD	<i>ribosomal methyltransferase D</i>
RNAr	Ácido ribonucléico ribossomal
SPM-1	São Paulo metalo-beta-lactamase
TSI	<i>Triplice Sugar Iron</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Infecções em pacientes oncológicos	17
2.2 <i>Acinetobacter</i> spp.	20
2.3 Aminoglicosídeos	22
2.4 Resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Desenho do estudo	28
4.2 Local do estudo	28
4.3 População do estudo	28
4.4 Definição e categorização das variáveis do estudo	28
4.5 Técnicas laboratoriais empregadas	29
4.5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	29
4.5.2 Extração do DNA total	31
4.5.3 Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
4.5.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	33
4.5.4.1 Preparação dos plugs com o DNA bacteriano	33
4.5.4.2 Digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição	34
4.5.4.3 Preparação do gel de agarose	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Caracterização fenotípica e genética da resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S de isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, Brasil	36
5.2 Disseminação clonal de isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. portadores dos genes de metilases RNAr 16S em um hospital oncológico do Recife, Brasil	46
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – ARTIGO 1 EM INGLÊS	57

APÊNDICE B – ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	70
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 AO JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY.....	78
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2 AO INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION.....	79

1 INTRODUÇÃO

Pacientes com câncer e malignidades hematológicas apresentam um maior risco de adquirir infecções (COSTA; ATTA; SILVA, 2015). Os antimicrobianos aminoglicosídeos são amplamente utilizados na prática clínica, especialmente para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas como *Acinetobacter* spp. (AGHAZADEH *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2010). No entanto, entre vários mecanismos de resistência, a produção das enzimas metilases RNAr 16S adquiridas surgiu como uma ameaça significativa para a eficácia clínica destes antimicrobianos (CORRÊA *et al.*, 2015).

Estas enzimas modificam o sítio de ligação dos aminoglicosídeos no RNAr 16S conferindo alto nível de resistência aos mesmos. A modificação predominante no RNAr 16S em bactérias patogênicas é a metilação da posição N7 do nucleotídeo G1405 (m⁷ G1405), com nove enzimas distintas, reportadas até o momento em isolados clínicos e veterinários, codificadas pelos genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* e *rmtH* (CORRÊA *et al.*, 2015).

Abordando a metilação do RNAr 16S, Tada *et al.* (2013) realizaram um estudo em dois hospitais do Vietnã e verificaram que entre 101 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, provenientes de duas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), 70 (71,3%) foram altamente resistentes à amicacina, arbecacina e gentamicina, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) superiores a 1.024 mg/L. Estes autores observaram também que entre os 70 isolados, 61 apresentaram o gene *armA* e os 9 restantes, o gene *rmtB*. Em uma pesquisa desenvolvida com isolados clínicos de gram-negativos oriundos de 169 hospitais japoneses, todos os isolados positivos para metilases RNAr 16S foram altamente resistentes (CIMs > 1.024 mg/L) a todos os aminoglicosídeos pertencentes ao grupo das 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas (YAMANE *et al.*, 2007). Em um trabalho executado em Teerã, oito (26%) isolados clínicos de *A. baumannii* altamente resistentes à amicacina (CIMs ≥ 256 µg/mL) foram positivos para o gene *armA* (AGHAZADEH *et al.*, 2013).

Doi *et al.*, (2007a) detectaram a metilase RmtD (*ribosomal methyltransferase D*) em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de um paciente internado em um hospital no Brasil em 2005. Conforme estes autores esta foi a primeira identificação da resistência aos aminoglicosídeos mediada por uma metilase RNAr 16S na América do Sul. No Brasil, há relatos também da ocorrência dos genes *rmtB* (FRITSCHÉ *et al.*, 2008), *rmtG* (BUENO *et al.*, 2013) e *armA* (QUILES *et al.*, 2015a). Em um trabalho realizado com 9 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, resistentes aos carbapenêmicos provenientes de três

hospitais públicos do Recife, o gene *rmtD* foi detectado em um isolado que apresentou uma elevada CIM de arbecacina (128 µg/mL) (CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Na abordagem do referido mecanismo de resistência, é comum a avaliação do perfil clonal dos isolados clínicos. Observou-se na Bulgária, uma elevada relação clonal (72%) entre os produtores de ArmA (*aminoglycoside resistance methyltransferase*), indicando a presença de um clone endêmico no Hospital Universitário de Alexandrovska (STRATEVA *et al.*, 2012). Em outra pesquisa executada por Zhou *et al.* (2010), em um hospital chinês, os resultados obtidos pela técnica ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus-polimerase chain reaction*) indicaram que os genes detectados (*armA* e *rmtB*) não foram apenas difundidos por transferência horizontal, houve também disseminação clonal, neste hospital. Lee *et al.* (2006) verificaram que entre 14 isolados de *A. baumannii* portadores do gene *armA* oriundos de um hospital da Coreia, seis apresentaram padrões idênticos de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), sugerindo um surto clonal. No Brasil, Lincopan *et al.* (2010) relataram dois casos raros de balanopostite em um hospital de São Paulo, causada por isolados de *P. aeruginosa* produtores de RmtD e os resultados da ERIC-PCR, revelaram que os isolados apresentavam relação clonal.

Além dos trabalhos anteriormente mencionados, há outros estudos realizados no Brasil e em diferentes países (BRIGANTE *et al.*, 2012; DOI *et al.*, 2007b; JIN *et al.*, 2009; KARAH *et al.*, 2011; YAMANE *et al.*, 2005; YOKOYAMA *et al.*, 2003) discutindo sobre o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos, a ocorrência dos genes codificadores de metilases RNAr 16S e o perfil clonal de isolados clínicos de bactérias gram-negativas, no entanto a realização de mais estudos é importante, uma vez que estas características variam entre os hospitais (LEE *et al.*, 2006; WEN *et al.*, 2014; YAMANE *et al.*, 2007). Vale salientar que os dados de prevalência sobre as metilases RNAr 16S adquiridas permanecem relativamente escassos (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, e dos resistentes a ambos antimicrobianos, determinar a CIM de amicacina, gentamicina e tobramicina e caracterizar os perfis genético (*armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*) e clonal, a fim de se obter dados fenotípicos e moleculares locais referentes ao mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos mediado por metilases RNAr 16S, que podem ser úteis, para ressaltar a importância da implementação de procedimentos, para controlar a disseminação do mesmo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções em pacientes oncológicos

Uma série de fatores contribui para os pacientes oncológicos apresentarem um maior risco de infecções, incluindo imunossupressão relacionada à doença e tratamentos agressivos, como quimioterapia, radioterapia, uso de esteróides e transplante de células-tronco hematopoiéticas. Como resultado, a infecção continua a ser uma complicação frequente em pacientes com câncer e é responsável pelas admissões na UTI (COSTA; ATTA; SILVA, 2015).

Montassier *et al.* (2013) abordaram as mudanças na bacteremia em pacientes com câncer, através de uma revisão sistemática da epidemiologia e resistência antimicrobiana, pesquisando artigos publicados desde 2008 e afirmaram que houve alterações significativas no espectro de microrganismos, isolados na cultura sanguínea nos pacientes com câncer, nos últimos anos. No início do uso da quimioterapia citotóxica, infecções por bactérias gram-negativas foram as mais comuns. Ao longo das últimas três décadas, a proporção de microrganismos gram-positivos aumentou, devido ao uso generalizado de cateteres. Estudos mostraram que a bacteremia causada por gram-negativas não fermentadoras, incluindo espécies de *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*, tem emergido em pacientes com câncer. Os referidos autores também citam que taxas crescentes de resistência aos antimicrobianos em pacientes com câncer são relatadas. De acordo com esta revisão sistemática, as bactérias gram-negativas foram os microrganismos mais frequentes isolados de bacteremia em pacientes com câncer.

A resistência antimicrobiana é um problema global e os pacientes com malignidades subjacentes são impactados desproporcionalmente por essa tendência emergente. A resistência aos antimicrobianos é comum entre os pacientes com câncer (ZEMBOWER, 2014).

Nas últimas décadas, o tratamento bem sucedido de neoplasias malignas em crianças e adolescentes tem aumentado, com 70 a 80% dos casos com resultados favoráveis. No entanto, a imunossupressão resultante do tratamento torna esses pacientes mais suscetíveis às infecções, que são a principal causa de morte nesta população. Nestes pacientes, a bacteremia geralmente resulta de infecção com um ou mais microrganismos, predominantemente membros da *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (QUILES *et al.*, 2015b). Em um trabalho desenvolvido no serviço de oncologia pediátrica do

centro de cirurgia pediátrica do hospital universitário da Universidade de Brasília, em 30 (65,2%) dos 46 episódios de neutropenia febril, foi colhido material para, pelo menos uma hemocultura, com positividade de 53% (MIRANDA *et al.*, 2002).

Mohammed *et al.* (2014) realizaram um estudo na Arábia Saudita, em pacientes com câncer terminal e relataram que os principais locais de infecção foram o trato respiratório, trato urinário e ferida. Entre os episódios infecciosos, os resultados da cultura bacteriológica foram positivos para 98 pacientes (40%) e negativos para 145 pacientes (60%). Os microrganismos gram-negativos foram os dominantes (gram-negativos, 64; gram-positivos, 22).

Em uma pesquisa executada no Hospital do Câncer de Barretos, em São Paulo, com 210 indivíduos submetidos a cirurgias oncológicas do sistema digestivo, seguidos prospectivamente por 30 dias após a cirurgia, Castro *et al.* (2011) relataram que nas infecções do sítio cirúrgico as bactérias gram-negativas foram isoladas com maior frequência, totalizando 31 casos, com *Escherichia coli* sendo a mais prevalente. Bactérias consideradas multidroga resistentes (MDR) foram isoladas de apenas sete casos, principalmente *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (CASTRO *et al.*, 2011).

Zembower (2014), em um estudo, nos Estados Unidos da América sobre a epidemiologia das infecções em pacientes com câncer, ao analisar leucemia aguda e linfoma, verificou que, classicamente, os bacilos gram-negativos, como *E. coli*, *Klebsiella* spp., e *P. aeruginosa* causam as primeiras infecções em pacientes neutropênicos. Além disso, os pacientes que permanecem neutropênicos por períodos prolongados de tempo são mais propensos a desenvolver infecções por bactérias resistentes aos medicamentos, como *Enterococcus* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas cepacia* e *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltofilia*. Estes emergem como consequência de cursos prolongados de antimicrobianos de amplo espectro (ZEMBOWER, 2014).

Wong; Evans, (2017) reportaram, entre outros patógenos, *Acinetobacter baumannii* como um dos envolvidos na pneumonia bacteriana comumente associada à neutropenia induzida pela quimioterapia.

Osmani *et al.* (2017) verificaram as mudanças consideráveis que ocorreram ao longo das últimas décadas, no padrão de patógenos que causam infecções em pacientes com neutropenia febril e citaram que *S. aureus* foi o isolado bacteriano mais frequente desses pacientes, nos anos 1950 e início dos anos 1960, mas foi posteriormente substituído por bacilos gram-negativos, incluindo *E. coli*, espécies de *Klebsiella* e *P. aeruginosa*. No entanto,

desde a década de 1980, o ressurgimento de organismos gram-positivos é evidente nessa população de pacientes. Recentemente, relatórios de países em desenvolvimento mostraram predominância contínua de bacilos gram-negativos em casos de neutropenia febril. Estes autores realizaram um estudo com 156 pacientes com neutropenia febril admitidos no serviço de Hematologia/Oncologia de um hospital, no Paquistão e verificaram que 34% dos pacientes apresentaram bacteremia causada por gram-positiva, 57% por gram-negativa e 9% estavam infectados com ambas. Entre 73 culturas de gram-positivas, 44% foram espécies de *Staphylococcus* e entre 123 culturas de gram-negativas, 43% foram *E. coli* e a frequência de *Acinetobacter* foi de 8% (OSMANI *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado em pacientes da UTI de um centro de câncer no México, 134 deles desenvolveram 159 infecções. De todas estas 159 infecções nosocomiais, 145 (91,2%) foram confirmadas pela cultura. Foram isolados 266 microrganismos, dos quais 105 foram considerados MDR, a prevalência geral foi de 39,5%. Estes microrganismos foram distribuídos da seguinte forma: 148 gram-negativos (55,6%), 86 gram-positivos (32,3%) e 32 leveduras (12,1%). Os microrganismos mais frequentes foram *E. coli* (n = 54, 20%, 94,4% destes foram produtores de ESBL - beta-lactamase de espectro estendido), *S. aureus* (n = 32, 12%, 90,6% destes foram MRSA), *Enterococcus faecium* (n = 32, 12%, 18,7% foram VRE-*Enterococcus* resistente à vancomicina), *P. aeruginosa* (n = 29, 11%, 14% foram MDR) e *A. baumannii* (n = 15, 6%; todos MDR) (CORNEJO-JUÁREZ *et al.*, 2015).

Durante um estudo realizado no Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Rio de Janeiro, houve 101 casos de infecções por bactérias gram-negativas em 76 pacientes em 86 admissões e 47 (46,5%) destes casos foram relacionados às bactérias gram-negativas MDR. As bactérias gram-negativas MDR mais frequentes foram as seguintes: *A. baumannii*, oito (17%); *S. maltophilia*, sete (15%); *Enterobacter* spp., sete (15%) e *Klebsiella pneumoniae*, sete (15%). As bactérias gram-negativas não MDR mais frequentes foram as seguintes: *P. aeruginosa*, 22 (41%); *A. baumannii*, 14 (26%) e *K. pneumoniae*, oito (15%). Entre as infecções por bactérias gram-negativas, os casos de infecção por bactéria MDR ocorreram nas seguintes frequências para cada uma das linhagens bacterianas: 100% (n = 2/2) de *Morganella morganii*, 100% (n = 1/1) de *Citrobacter* spp., 87,5% (n = 7/8) de *Enterobacter* spp., 50% (n = 5/10) de *E. coli*, 46,6% (n = 7/15) de *K. pneumoniae*, 36,4% (n = 8/22) de *A. baumannii*, 18,5% (n = 5/27) de *P. aeruginosa* e 0% (n = 0/2) de *Proteus mirabilis*. Houve três casos de infecção polimicrobiana: um causado por *K. pneumoniae* e *E. coli* não MDR, um por *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* não MDR, e um por *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* MDR (COSTA; ATTA; SILVA, 2015).

Conforme Cornejo-Juárez *et al.* (2015), o risco de infecção por bactéria MDR tem sido relacionado a uma série de fatores, incluindo terapia antimicrobiana anterior, transmissão cruzada e duração da internação. Pacientes com câncer em estado crítico admitidos na UTI têm um maior risco de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) por bactérias MDR que pode implicar, negativamente, em mortalidade, tornando os enormes esforços para curar e controlar o câncer, ineficazes. Estes autores ressaltam que 88% dos pacientes, analisados por eles, que desenvolveram IRAS e morreram, apresentaram uma bactéria MDR isolada, refletindo a relação entre essas bactérias MDR e o alto risco de mortalidade (CORNEJO-JUÁREZ *et al.*, 2015).

2.2 *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter é uma bactéria gram-negativa da família *Moraxellaceae*, da ordem *Gammaproteo-bacteria*. O gênero *Acinetobacter* spp. compreende 31 espécies diferentes, sendo que 17 delas não foram nomeadas pois raramente são isoladas em humanos. *A. baumannii* é a espécie mais importante clinicamente, fazendo parte do complexo *A. baumannii-calcoaceticus* que compreende quatro diferentes espécies (*Acinetobacter pittii*, anteriormente denominada genoespécie 3; *Acinetobacter nosocomialis*, anteriormente denominada genoespécie 13TU; *Acinetobacter calcoaceticus*; e *A. baumannii*). A distinção dessas espécies requer métodos de biologia molecular, que não são utilizados de rotina no laboratório clínico (MARTINS; BARTH, 2013; RANI *et al.*, 2017).

Na década de 1960, *Acinetobacter* spp. foi considerado um patógeno comensal com significância clínica limitada. Ao longo dos últimos 30 anos, a incidência de infecções hospitalares causadas por *Acinetobacter* spp. tem aumentado consideravelmente. Está relacionada ao crescente número de procedimentos médicos altamente especializados que afetam a imunidade do paciente. A incidência e gravidade de infecções nosocomiais por *Acinetobacter* spp. estão além disso, associadas à simplicidade de suas necessidades nutricionais e à baixa susceptibilidade às condições ambientais adversas, bem como à notável habilidade deste microrganismo de adquirir determinantes de resistência a vários agentes antimicrobianos (NOWAK; PALUCHOWSKA; BUDAK, 2014; POULIKAKOS; TANSARLI; FALAGAS, 2014).

Acinetobacter spp. é um importante patógeno adquirido no meio hospitalar que causa vários tipos de infecções humanas associadas com significativa morbidade e mortalidade (CHO *et al.*, 2009; GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

Foram identificados vários fatores de risco para a aquisição de infecções por *A. baumannii*, entre os quais estão inclusos: doença subjacente grave, ventilação mecânica prolongada, antibioticoterapia prévia, colonização prévia por *Acinetobacter* e permanência prolongada em UTI (FARIÑAS; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2013).

A. baumannii está amplamente distribuído no ambiente hospitalar e é um importante patógeno oportunista responsável por uma diversidade de infecções nosocomiais, compreendendo bacteremia, infecção do trato urinário, meningite secundária, infecção do sítio cirúrgico e pneumonia associada à ventilação, especialmente em pacientes da UTI e das enfermarias cirúrgicas (STRATEVA *et al.*, 2011; ZARRILLI *et al.*, 2004).

Entre os antimicrobianos frequentemente usados no tratamento de infecções por *A. baumannii*, os carbapenêmicos e aminoglicosídeos são notáveis. Carbapenêmicos produzem atividade bactericida sinérgica em combinação com aminoglicosídeos; portanto carbapenêmicos são frequentemente utilizados em terapia combinada com aminoglicosídeos (NOWAK; PALUCHOWSKA; BUDAK, 2014).

A. baumannii MDR surgiu de modo crescente como um patógeno responsável por infecções adquiridas em hospitais no mundo inteiro. Carbapenêmicos e aminoglicosídeos podem produzir um efeito sinérgico e assim são frequentemente usados juntos em infecções por *A. baumannii* MDR. Portanto linhagens resistentes a esses antimicrobianos tem um impacto clínico considerável (STRATEVA *et al.*, 2012).

O vasto uso de antimicrobianos nos hospitais tem contribuído para a emergência e aumento do número de linhagens de *A. baumannii* resistentes a uma variedade de antimicrobianos incluindo beta-lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (BRIGANTE *et al.*, 2012; KARAH *et al.*, 2011; ZARRILLI *et al.*, 2004).

Altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos devido à produção de metilases RNAr 16S em *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* a *Acinetobacter* spp. têm sido documentado desde 2003 (KARTHIKEYAN; THIRUNARAYAN; KRISHNAN, 2010).

Wong *et al.* (2017) realizaram uma revisão sobre infecções por *Acinetobacter* spp. e afirmaram que as mesmas se espalharam rapidamente através de hospitais em todo o mundo. A maior frequência de infecções ocorre em UTIs. Os dados de vigilância da Rede Nacional de Segurança de Saúde dos EUA relataram que *Acinetobacter* spp. causaram 1,8% de todas as IRAS. Com base em estudos de vigilância de redes hospitalares, a frequência é similar em UTIs em toda a Europa e América Latina. No entanto, na China, Tailândia, Taiwan, Vietnã e em alguns países da América do Sul, *Acinetobacter* provoca uma proporção muito maior de infecções nosocomiais e pode ser o patógeno nosocomial

predominante. Também está se tornando um patógeno nosocomial predominante na Índia. Nos países asiáticos e em certos países latino-americanos, *Acinetobacter* é uma das três causas mais comuns de bacteremia e pneumonia nosocomial. Estima-se que há, por ano, 1 milhão (intervalo, 600.000 a 1.400.000) de casos globais de infecções por *Acinetobacter* (WONG *et al.*, 2017).

O aumento da frequência de infecções hospitalares associadas a espécies de *Acinetobacter* e o rápido desenvolvimento de resistência destes microrganismos têm se tornado um problema grave de saúde pública. Assim, o entendimento dos mecanismos de resistência, responsáveis por esta situação, e de práticas adequadas de controle de infecção, são fundamentais para manejar melhor essas infecções (MARTINS; BARTH, 2013).

2.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos foram identificados através do rastreo sistemático de Actinobacteria do solo que começou na década de 1940. O primeiro aminoglicosídeo estreptomicina, foi descoberto a partir de *Streptomyces griseus* e utilizado com sucesso para o tratamento da tuberculose e, em seguida, de infecções por bactérias gram-negativas. Desde a descoberta da estreptomicina em 1944, os antibióticos aminoglicosídeos se revelaram inestimáveis no tratamento de várias doenças infecciosas. Eles têm um amplo espectro de atividade, são bactericidas e relativamente não dispendiosos para serem produzidos. Estas vantagens devem ser ponderadas contra a reduzida penetração em certos tecidos e o potencial para efeitos adversos sérios destes antibióticos. Os aminoglicosídeos têm um amplo espectro antibacteriano com boa atividade contra estafilococos, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; HANBERGER *et al.*, 2013; JACKSON; CHEN; BUISING, 2013).

Na década de 1980, o uso dos aminoglicosídeos como monoterapia para sepse por bactérias gram-negativas foi substituído por novas cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas com um efeito de amplo espectro contra estas bactérias e com menos toxicidade que os aminoglicosídeos. Em décadas recentes, os beta-lactâmicos frequentemente têm sido combinados com um aminoglicosídeo para o tratamento de sepse grave/choque séptico para ampliar o espectro antibacteriano e alcançar um rápido efeito bactericida e possível efeito sinérgico (HANBERGER *et al.*, 2013).

O nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente

está em posição central. Os aminoglicosídeos podem ser convenientemente divididos em três tipos, de acordo com a posição das suas ligações glicosídicas. Estes tipos estruturais incluem as 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas, que contêm a maioria dos aminoglicosídeos clinicamente úteis como gentamicina, tobramicina, ampicacina e netilmicina; as 4,5-dissubstituídas deoxiestreptaminas, que incluem a neomicina e a paromomicina; e outros como estreptomicina e espectinomicina (JANA; DEB, 2006; MAGNET, BLANCHARD, 2005; SOUZA *et al.*, 2008).

Estes antibióticos se ligam ao altamente conservado sítio A (sítio Aminoacil) do RNAr 16S da subunidade ribossomal bacteriana 30S, interferindo na síntese protéica, com subsequente morte bacteriana (BOGAERTS *et al.*, 2007).

As concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas estão próximas das doses tóxicas (baixo índice terapêutico). A toxicidade celular é característica comum dos aminoglicosídeos (exceto a espectinomicina), em função de sua absorção para o meio intracelular. Os seus efeitos tóxicos mais importantes são nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular. A frequência relatada destes efeitos colaterais tem ampla variação, devido a diferentes critérios utilizados para diagnóstico. O bloqueio neuromuscular é raro, a ototoxicidade varia de 0 a 62% (coclear) e 0 a 19% (vestibular) e a nefrotoxicidade varia de 0 a 50% (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

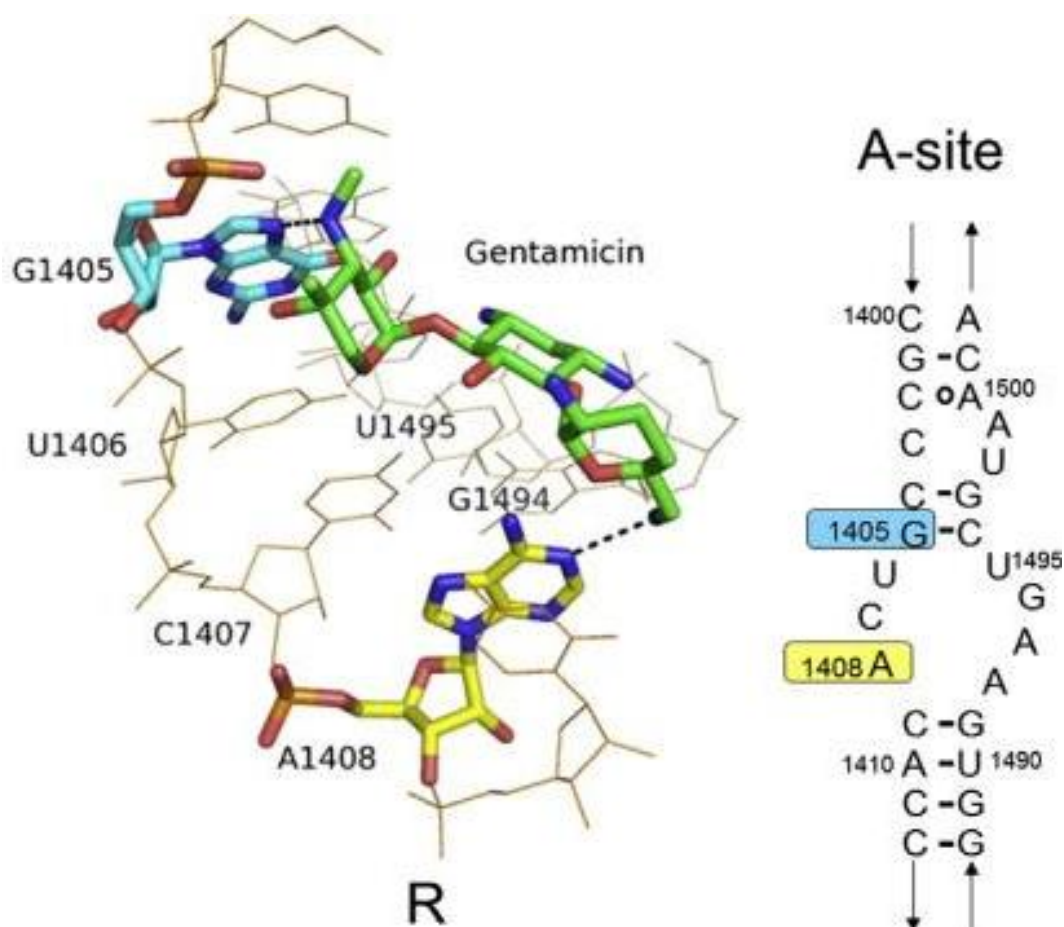
Os mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos têm sido objeto de pesquisa de numerosos estudos bioquímicos e genéticos. Estes mecanismos de resistência incluem: redução da concentração intracelular do antibiótico nas células bacterianas, geralmente pelo efluxo do agente; alteração do alvo molecular do antibiótico e inativação enzimática do aminoglicosídeo, que é o mecanismo mais comum, atualmente, mais de cem enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) foram encontradas em uma gama de microrganismos gram-positivos e gram-negativos (AGHAZADEH *et al.*, 2013; JANA; DEB, 2006; YU; ZHANG; DENG, 2017).

2.4 Resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S

Há duas causas principais para a resistência dos bacilos gram-negativos aos aminoglicosídeos. A primeira ocorre quando os aminoglicosídeos entram na bactéria, são modificados pelas EMAs e se tornam não funcionais. A segunda consiste na metilação do sítio alvo induzida pelas metilases RNAr 16S, levando à diminuição da afinidade do RNAr 16S pelos aminoglicosídeos (WEN *et al.*, 2014).

A modificação do RNAr 16S é comumente observada entre as Actinobactérias produtoras de aminoglicosídeos, incluindo *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp., que são naturalmente resistentes a esses próprios metabólitos. Este processo é mediado por metilação da posição N-7 do nucleótido G1405 ou da posição N-1 do nucleótido A1408 no RNAr 16S por várias metilases RNAr 16S (Figura 1). Metilases RNAr 16S N7-G1405 intrínsecas são encontradas em ambos *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp., enquanto que as metilases RNAr 16S N1-A1408 intrínsecas só foram identificadas em *Streptomyces* spp. Metilases RNAr 16S N7-G1405 conferem resistência às 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas, como gentamicina, tobramicina e amikacina, mas não às 4,5-dissubstituídas deoxiestreptaminas e monossusbtituídas. Em contraste, as metilases RNAr 16S N1-A1408 são capazes de conferir resistência a todos esses grupos (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

Figura 1 - Estrutura tridimensional do sítio A do RNAr 16S ligado à gentamicina.



Fonte: DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016.

Independentemente da diversidade estrutural, o anel I dos aminoglicosídeos geralmente entra em contato com a posição N1-A1408, consequentemente, as metilases RNAr 16S N1-A1408 podem conferir resistência a uma variedade de aminoglicosídeos incluindo 4,6 e 4,5-dissubstituídas deoxiestreptaminas e apramicina (WACHINO; ARAKAWA, 2012).

Isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos clinicamente úteis, devido à produção de metilases RNAr 16S adquiridas, foram identificados na França e no Japão, respectivamente, em 2003. Os genes de metilases RNAr 16S estão principalmente localizados em plasmídeos e podem ser facilmente transferidos para outras espécies bacterianas. Depois destes relatos, o número de isolados clínicos de gram-negativas produtoras de metilases RNAr 16S aumentou gradualmente (DOI; ARAKAWA, 2007; WACHINO; ARAKAWA, 2012).

Até o presente momento, 10 tipos de metilases RNAr 16S (ArmA, RmtA a RmtH e NpmA) foram detectados em vários patógenos nosocomiais (WANGKHEIMAYUM *et al.*, 2017).

Apenas uma única metilase RNAr 16S N1-A1408 adquirida foi descoberta até o momento. Esta enzima, chamada NpmA, foi identificada a partir de um isolado clínico de *E. coli* no Japão em 2007. NpmA confere um espectro mais amplo de resistência aos aminoglicosídeos que inclui neomicina e apramicina além de gentamicina, tobramicina e amicacina (Tabela 1) e possui uma sequência de aminoácidos que é distinta das metilases RNAr 16S N7-G1405 (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

Tabela 1 - Fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos gerados pelas metilases RNAr 16S N7-G1405 e N1-A1408.

Aminoglicosídeos	Metilases RNAr 16S N7-G1405	Metilase RNAr 16S N1-A1408
	ArmA e RmtA a RmtH	NpmA
4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas (gentamicina, amicacina, tobramicina)	Resistente	Resistente
4,5-dissubstituídas deoxiestreptaminas (neomicina)	Sensível	Resistente

Fonte: adaptada de DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016.

As metilases RNAr 16S (m^7 G1405) adquiridas são distribuídas globalmente, e os genes que as codificam normalmente residem dentro de elementos móveis que podem abrigar determinantes de resistência adicionais. Foram relatados principalmente microrganismos portadores de genes de metilases RNAr 16S com ESBL e determinantes da resistência aos carbapenêmicos (Tabela 2). No Brasil, por exemplo, a enzima RmtD foi detectada pela

primeira vez em *P. aeruginosa* produtora de SPM-1, enquanto em outro estudo RmtD e RmtG foram identificadas em *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 e CTX-M (BUENO *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2015; DOI *et al.*, 2007a; WANGKHEIMAYUM *et al.*, 2017).

Tabela 2 - Visão geral das metilases RNAr 16S N7-G1405 e N1-A1408.

Metilases RNAr 16S	Espécies comuns	Co-resistência comum	Prevalência	Distribuição
ArmA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	CTX-M ESBL NDM carbapenemase OXA-23 carbapenemase	Muito alta em <i>A. baumannii</i> Alta entre produtores de NDM	Mundial
RmtA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	Baixa	Japão, Coreia
RmtB	<i>Escherichia coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M ESBL NDM carbapenemase	Alta na China Alta entre produtores de NDM	Mundial
RmtC	<i>K. pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	NDM carbapenemase	Alta entre produtores de NDM	Índia, Reino Unido
RmtD	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M ESBL KPC carbapenemase	Baixa	América do Sul
RmtE	<i>E. coli</i>	CMY-2 <u>AmpC</u>	Muito baixa	Estados Unidos da América
RmtF	<i>K. pneumoniae</i>	NDM carbapenemase	Alta entre produtores de NDM	Índia, Reino Unido
RmtG	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M ESBL KPC carbapenemase	Baixa	América do Sul
RmtH	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M ESBL	Muito baixa	Iraque
NpmA	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Enterobacter spp.</i>	—	Muito baixa	Japão, Arábia Saudita

Fonte: adaptada de DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016.

O trabalho realizado por Doi *et al.* (2007a) com um isolado clínico de *P. aeruginosa*, oriundo de um hospital brasileiro e obtido em 2005, além de representar a primeira identificação da resistência aos aminoglicosídeos mediada por uma metilase RNAr 16S na América do Sul, representa também o primeiro registro da coprodução de uma metalo-beta-lactamase (MBL) e de uma metilase RNAr 16S, RmtD, uma combinação que compromete seriamente as opções terapêuticas para pacientes infectados (DOI *et al.*, 2007a). Lincopan *et al.* (2010) relataram dois casos raros de balanopostite em um hospital pediátrico de hematologia e oncologia de São Paulo, causada por *P. aeruginosa* coproduzindo MBL do tipo SPM-1 e metilase RNAr 16S RmtD. Quanto aos resultados da ERIC-PCR, os isolados apresentaram perfis de bandas indênticos (LINCOPAN *et al.*, 2010).

Definir os mecanismos moleculares da resistência antimicrobiana é fundamental para apoiar o desenvolvimento de novas estratégias eficazes para combater os patógenos MDR (CORRÊA *et al.*, 2015). Diferenças regionais na resistência bacteriana aos antimicrobianos têm sido observadas e os genes de resistência transportados por alguns isolados também variam entre diferentes locais (WEN *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015, e dos resistentes a ambos antimicrobianos, determinar a CIM de amicacina, gentamicina e tobramicina e caracterizar os perfis genético (*armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*) e clonal.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de susceptibilidade à amicacina e à gentamicina dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015.
- Determinar as CIMs dos antimicrobianos amicacina, gentamicina e tobramicina para os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015, que apresentaram resistência a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina.
- Determinar a frequência dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* nos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015, que apresentaram resistência a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina.
- Determinar o perfil clonal dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015, que apresentaram resistência a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de base laboratorial. Através deste, serão obtidos dados concernentes à resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, durante os anos de 2014 e 2015, que poderão servir de auxílio para salientar a importância da implementação de procedimentos para controlar a disseminação da mesma.

4.2 Local do estudo

O hospital que forneceu os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., durante os anos de 2014 e 2015, foi o Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

Os isolados clínicos supracitados foram transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no qual foram realizados os testes fenotípicos e uma parte dos testes moleculares. A outra parte dos testes moleculares foi realizada no Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fiocruz, Pernambuco.

4.3 População do estudo

Os isolados clínicos analisados foram provenientes de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. Estes isolados foram fornecidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do HCP, durante os anos de 2014 e 2015 e faziam parte de um projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCP (número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE: 05554812.7.0000.5205).

4.4 Definição e categorização das variáveis do estudo

As variáveis deste estudo estão descritas a seguir (Tabela 3):

Tabela 3 - Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência mediada por metilases RNAr 16S.

Variáveis	Definição	Categorização
<i>armA</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>ArmA (aminoglycoside resistance methyltransferase)</i> , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtB</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>RmtB (ribosomal methyltransferase B)</i> , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtC</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>RmtC (ribosomal methyltransferase C)</i> , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtD</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>RmtD (ribosomal methyltransferase D)</i> , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente

4.5 Técnicas laboratoriais empregadas

4.5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. fornecidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do HCP, foram semeados em ágar Casoy e transportados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE. Os tubos contendo ágar Casoy foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Em seguida, foi feita a suspensão direta das colônias em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e os tubos foram incubados nas condições anteriormente citadas. Uma alíquota de cada cultura foi adicionada ao glicerol (25%) e estocada a -20 °C. Para a verificação da pureza das colônias, os isolados que estavam congelados foram inoculados em caldo BHI e após incubação a 37 °C, durante 48 horas, foram semeados em ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB). Posteriormente foram submetidos aos testes da oxidase e *Triplice Sugar Iron* (TSI).

A partir de suspensões de cada isolado em BHI, com uma turbidez de 0,5 da escala de Mc Farland, foi realizado o antibiograma através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-

Hinton, utilizando os antimicrobianos amicacina (30 µg) e gentamicina (10 µg), segundo os padrões estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle. Utilizou-se um paquímetro para leitura dos halos de inibição, cujos resultados foram expressos em milímetros e interpretados conforme os padrões estabelecidos pelo CLSI (2016).

Para os isolados que apresentaram resistência concomitante à amicacina e à gentamicina (Tabela 4) foi determinada também a CIM dos antimicrobianos gentamicina, amicacina e tobramicina, através da microdiluição em caldo, conforme os padrões estabelecidos pelo CLSI (2016). CIM é a menor quantidade do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um microrganismo teste (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A determinação da CIM foi realizada de acordo com o CLSI (2016). Inicialmente, foram preparadas suspensões bacterianas em caldo Mueller-Hinton ajustado com cátions (CAMHB), utilizando-se as colônias dos isolados que foram previamente semeadas em BHI. Após incubação a 35 ± 2 °C, durante 20 a 24 horas, a turbidez destas suspensões foi ajustada para 0,5 da escala de Mc Farland.

Para a determinação da CIM, foram utilizadas placas de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) estéreis, com 96 poços, nos quais foi distribuído o meio CAMHB, em seguida foi realizada a diluição das soluções dos antimicrobianos, utilizando-se pipeta multicanal e por último foram adicionadas, nas colunas correspondentes a cada isolado, alíquotas das suspensões bacterianas anteriormente mencionadas. Para gentamicina e tobramicina foram avaliadas concentrações de 0,5 a 64 µg/mL e para amicacina foram avaliadas concentrações de 2 a 256 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se a *P. aeruginosa* ATCC 27853. O controle negativo correspondia aos poços sem inoculação da suspensão bacteriana. Todas as amostras foram testadas em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 20 a 24 horas.

Para a realização da leitura, utilizou-se a resazurina, um corante de viabilidade celular. Após a incubação das placas de microdiluição foram adicionados 15 µL de resazurina em cada poço e as placas foram incubadas novamente por 1 hora a 35 ± 2 °C. Quando houve mudança da cor do poço de azul fracamente fluorescente para uma cor rosa com alta fluorescência, o ensaio de viabilidade foi considerado positivo para crescimento bacteriano. Mesmo uma mudança para cor roxa foi considerada crescimento. A interpretação dos valores das CIMs foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2016).

Tabela 4 - Caracterização dos isolados de *Acinetobacter* spp. com resistência concomitante à amicacina e à gentamicina quanto ao setor hospitalar e à amostra de origem.

Isolados	Setor hospitalar	Amostra
A1	Hematologia	sangue
A3	UTI	secreção traqueal
A7	UTI	secreção traqueal
A8	Hematologia	ponta de cateter
A10	UTI	líquido cavitário
A12	UTI	secreção traqueal
A15	Hematologia	sangue
A16	Hematologia	sangue
A21	UTI	sangue
A22	UTI	secreção traqueal
A24	Hematologia	sangue
A29	UTI	secreção traqueal

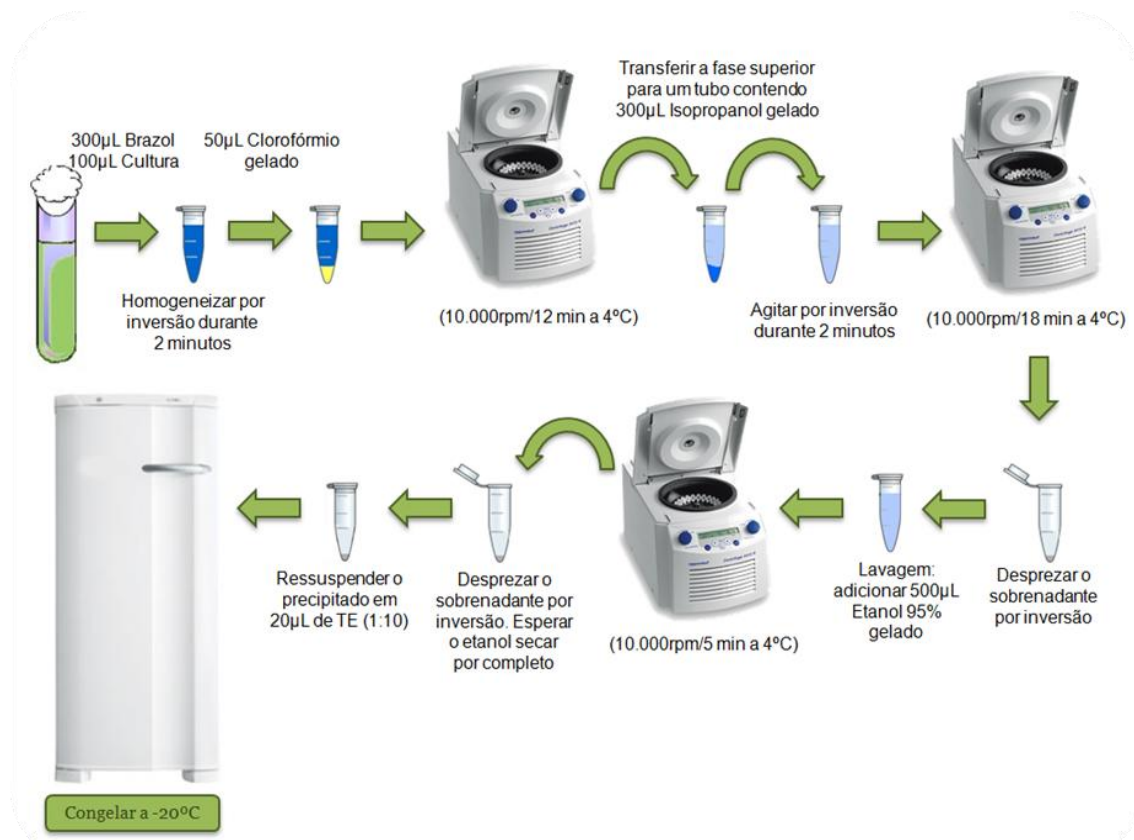
UTI: Unidade de Terapia Intensiva.

4.5.2 Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo Luria Bertani (LB) a 35 °C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total dos isolados que no teste de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram resistência concomitante à gentamicina e à amicacina. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante (Figura 2).

O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm (nanômetros).

Figura 2 - Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.



Fonte: JÁCOME, 2011.

4.5.3 Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Durante a realização da PCR dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* foram utilizados os *primers* descritos por Berçot; Poirel; Nordmann (2011) (Tabela 5). Para a detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo e incluiu: 1 µL (10 ng) de DNA total, 1 µL (10 pmol) de cada *primer*, 0,6 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µL de tampão (5x), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U). As reações de amplificação para o gene *rmtD*, foram realizadas no termociclador nas seguintes condições, descritas por Berçot; Poirel; Nordmann (2011): desnaturação inicial a 95 °C durante três minutos; seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C na etapa de desnaturação, 30 segundos a 54,5 °C na etapa de anelamento e 30 segundos a 72 °C na etapa de extensão; seguidos por uma única etapa de alongamento final a 72 °C durante cinco minutos. Para os genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* as condições foram as mesmas, exceto a temperatura de anelamento que para estes genes, foi de 52 °C, modificação realizada no laboratório onde esta pesquisa foi realizada. Durante a

realização da PCR, foram inclusos controles positivos para cada um dos genes pesquisados, os quais foram cedidos pelo pesquisador do IAM, Fiocruz, Pernambuco, PhD Danilo Elias Xavier, e foi incluso um controle negativo, correspondente a um tubo contendo todos os componentes da mistura ao qual não foi adicionado DNA molde. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Esses produtos foram corados com Blue, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Tabela 5 - *Primers* utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.

Genes	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>armA</i>	F (5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3')	101
	R (5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3')	
<i>rmtB</i>	F (5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3')	171
	R (5'-AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3')	
<i>rmtC</i>	F (5'-CAGGGGTTCACAACAAGT-3')	246
	R (5'-AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3')	
<i>rmtD</i>	F (5'-GGAAAAGGACGTGGACA-3')	171
	R (5'-TCCATCGATTCCACAGG-3')	

Fonte: adaptada de BERÇOT; POIREL; NORDMAN, 2011. F: *forward*, R: *reverse*, pb: pares de base.

4.5.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para a determinação da similaridade genética entre os isolados resistentes a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina, foi realizada a PFGE, com base em um protocolo do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade de São Paulo.

4.5.4.1 Preparação dos plugs com o DNA bacteriano

Foi preparada uma suspensão de cada um dos isolados em 5 mL de caldo LB. Estas suspensões foram incubadas na estufa com agitação, a 37 °C *overnight*. Após incubação, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. O líquido sobrenadante foi aspirado e desprezado. O centrifugado foi ressuspensão em 1 mL de salina e a suspensão foi transferida para microtubos previamente pesados. Os mesmos foram centrifugados por 30 segundos a 12000 rpm e foi aspirado o máximo de salina possível. O centrifugado foi pesado e foi

adicionado ao mesmo, um volume de salina em microlitros igual ao peso das células do centrifugado em miligramas. Em seguida, foi homogeneizado no vórtex.

A agarose *Low Melt* 2% foi fundida e colocada em banho-maria a 58 °C. Uma alíquota da suspensão de células foi adicionada a 300 µL do tampão TEN (Tris 100 mM; NaCl 150 mM; EDTA 100 mM) e homogeneizada no vórtex. Em seguida, foram adicionados à suspensão 340 µL da agarose *Low Melt* 2% previamente fundida. A suspensão foi adicionada aos moldes para *plugs* e os mesmos ficaram esfriando durante 15 minutos a 5 °C.

Um volume de 2 mL de EC (Tris 6 mM; EDTA 0,01 M; NaCl 1 M; deoxiglicolato 0,2%; Brij 58 0,5%; sarcosil 0,5%) foi adicionado aos poços de uma placa para cultura de células e os mesmos foram identificados de acordo com os números dos *plugs*. Os *plugs* foram removidos dos moldes e colocados nos respectivos espaços da placa de cultura de células com EC. Foi adicionada a enzima lítica lisozima. Os *plugs* em EC foram incubados a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, o EC dos *plugs* foi aspirado e os mesmos foram enxaguados com 2 mL de CHEF-TE (Tris 0,1 M; EDTA 0,1 M), o CHEF-TE foi aspirado e os *plugs* foram lavados mais duas vezes com CHEF-TE, com intervalos de 30 minutos em temperatura ambiente. O CHEF-TE foi aspirado novamente e os *plugs* foram imersos em 2 mL de ES (EDTA 0,4 M; sarcosil 10%) e 100 µL de proteinase K em cada poço. A placa foi envolta em papel filme e incubada *overnight* a 50 °C. No dia seguinte, o ES foi aspirado dos poços onde estavam os *plugs* e os mesmos foram enxaguados com CHEF-TE. Foram feitas mais quatro lavagens com 2 mL de CHEF-TE a temperatura ambiente, com uma hora de intervalo entre as mesmas. As placas foram envoltas em papel filme e armazenadas a 5 °C, até o momento da digestão.

4.5.4.2 Digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição

Para a realização da digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição, inicialmente a tampa de uma placa de ELISA com 96 poços foi numerada, de acordo com o número de *plugs* prontos para digestão. Foram adicionados 200 µL de DNS (Tris 0,6 M; MgCl₂ 0,02 M) aos poços utilizados. Os *plugs* foram cortados no tamanho apropriado de acordo com o tamanho do pente e do aparelho de PFGE. O DNS foi removido dos poços, assim que o último *plug* foi colocado na placa. Os poços foram preenchidos novamente com tampão DNS e a placa foi incubada em temperatura ambiente durante uma hora. Esta lavagem foi repetida quatro vezes, substituindo o DNS a cada hora. Posteriormente o DNS foi substituído por 50 µL do tampão de enzima de restrição, sem a enzima. A placa foi incubada durante uma hora a

5 °C. Esse tampão foi substituído por 50 µL do tampão com a enzima de restrição (*SmaI*) (*New England Biolabs*). A placa foi envolta em papel filme e incubada por 1-2 horas a 5 °C. Em seguida, foi incubada por 12 a 20 horas na temperatura sugerida pelo fabricante da enzima.

4.5.4.3 Preparação do gel de agarose

Aos *plugs* preparados com DNA bacteriano foi adicionado o marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker N03406* (*New England Biolabs*), na placa. O tampão contido na placa foi removido e substituído por tampão TBE 10x. Este tampão foi substituído até completar duas horas de lavagem.

O pente foi ajustado horizontalmente entre duas estantes pequenas e os *plugs* e o marcador de peso molecular em duplicata foram colocados nas extremidades dos dentes do pente. Uma gota de agarose previamente fundida foi depositada em cima de cada *plug* e do marcador de peso molecular, aderindo os mesmos ao pente. Quando a mesma solidificou, o pente com os *plugs* e marcador aderidos foi colocado na posição vertical, sob o molde, em uma das extremidades. Foi adicionada agarose 1% previamente fundida, ao molde. Para a mesma solidificar, foram necessários aproximadamente 30 minutos. O pente foi removido e verificou-se se os *plugs* e o marcador de peso molecular ficaram depositados nos poços do gel de agarose. Os referidos poços nos quais estavam depositados os *plugs* e marcador de peso molecular foram preenchidos com agarose previamente fundida. A corrida foi realizada em sistema CHEF DR-III com *switch time* inicial-final (5.0-30), 6 volts/cm, durante 23 horas.

Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. Os padrões de banda foram analisados, através do *software BioNumerics* usando o método não ponderado de agrupamento aos pares com médias aritméticas (UPGMA), para a formação do dendrograma, e conforme os critérios de Tenover *et al.* (1995).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização fenotípica e genética da resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, Brasil

Introdução

Pacientes com câncer e malignidades hematológicas apresentam um maior risco de adquirir infecções [1]. Os antimicrobianos aminoglicosídeos são amplamente utilizados na prática clínica, especialmente para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas, como *Acinetobacter* spp. [2, 3]. No entanto, entre vários mecanismos de resistência, a produção das enzimas metilases RNAr 16S adquiridas surgiu como uma ameaça significativa, para a eficácia clínica destes antimicrobianos [4].

Estas enzimas modificam o sítio de ligação dos aminoglicosídeos no RNAr 16S, conferindo alto nível de resistência aos mesmos. A modificação predominante no RNAr 16S em bactérias patogênicas é a metilação da posição N7 do nucleotídeo G1405 (m^7 G1405), com nove enzimas distintas, reportadas até o momento em isolados clínicos e veterinários, codificadas pelos genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* e *rmtH* [4].

Abordando a metilação do RNAr 16S, Tada *et al.* [5] realizaram um estudo em dois hospitais do Vietnã e verificaram que entre 101 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, provenientes de duas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), 70 (71,3%) foram altamente resistentes à amicacina, arbecacina e gentamicina, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) superiores a 1.024 mg/L. Estes autores observaram também que entre os 70 isolados, 61 apresentaram o gene *armA* e os nove restantes, o gene *rmtB*. Em uma pesquisa desenvolvida com isolados clínicos de gram-negativos oriundos de 169 hospitais japoneses, todos os isolados positivos para metilases RNAr 16S foram altamente resistentes (CIMs > 1.024 mg/L) a todos os aminoglicosídeos pertencentes ao grupo das 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas [6]. Em um trabalho executado em Teerã, oito (26%) isolados clínicos de *A. baumannii* altamente resistentes à amicacina (CIMs $\geq$ 256 μ g/mL) foram positivos para o gene *armA* [2].

Doi *et al.* [7] detectaram a metilase RmtD (*ribosomal methyltransferase* D) em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de um paciente, em um hospital no Brasil, em 2005. Conforme estes autores, esta foi a primeira identificação da resistência aos

aminoglicosídeos mediada por uma metilase RNAr 16S na América do Sul. No Brasil, há relatos também da ocorrência dos genes *rmtB* [8], *rmtG* [9] e *armA* [10]. Em um trabalho realizado com nove isolados clínicos de *P. aeruginosa*, resistentes aos carbapenêmicos provenientes de três hospitais públicos do Recife, o gene *rmtD* foi detectado em um isolado que apresentou uma elevada CIM de arbecacina (128 µg/mL) [11].

Além dos trabalhos anteriormente mencionados, há outros estudos realizados no Brasil e em diferentes países [12-17] discorrendo sobre o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos e a ocorrência dos genes codificadores de metilases RNAr 16S em bactérias gram-negativas, no entanto a realização de mais estudos é importante, uma vez que estas características variam entre os hospitais [6, 18, 19]. Vale salientar que os dados de prevalência sobre as metilases RNAr 16S adquiridas permanecem relativamente escassos [20].

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, e dos resistentes a ambos antimicrobianos, determinar as CIMs de amicacina, gentamicina e tobramicina e caracterizar o perfil genético (*armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*), a fim de se obter dados fenotípicos e genéticos locais referentes ao mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos mediado por metilases RNAr 16S, que podem ser úteis, para ressaltar a importância da implementação de procedimentos, para controlar a disseminação do mesmo.

Metodologia

Isolados clínicos

Um total de 23 isolados clínicos foram provenientes de amostras diversas oriundas de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. de um hospital oncológico do Recife, Brasil, durante os anos de 2014 e 2015 e estavam estocados em glicerol (25%) a -20 °C. Para a verificação da pureza das colônias, foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e após incubação a 37 °C, durante 48 horas, foram semeados em ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB). Posteriormente foram submetidos aos testes da oxidase e *Triplice Sugar Iron* (TSI).

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Inicialmente, os antibiogramas dos 23 isolados foram realizados por meio da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, utilizando os antimicrobianos amicacina (30 µg) e gentamicina (10 µg), segundo os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [21].

Em seguida, para os isolados que apresentaram resistência concomitante à amicacina e à gentamicina, foi determinada também a CIM dos antimicrobianos amicacina, gentamicina e tobramicina, através da microdiluição em caldo, de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI (2016). Foi utilizada *P. aeruginosa* ATCC 27853 em ambas as técnicas, como controle.

Extração do DNA total

Para a pesquisa dos genes que codificam metilases RNAr 16S, foi realizada a extração do DNA total dos isolados que no teste de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram resistência concomitante à amicacina e à gentamicina. Após a incubação das colônias em caldo Luria Bertani (LB), a 35 °C durante 24 horas, a extração foi efetuada por meio do kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado, através de espectrofotometria.

Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Durante a realização da PCR dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* foram utilizados os *primers* descritos por Berçot; Poirel; Nordmann [22]. Para a detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo e incluiu: 1 µL (10 ng) de DNA total, 1 µL (10 pmol) de cada *primer*, 0,6 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µL de tampão (5x), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U). As reações de amplificação para o gene *rmtD*, foram realizadas no termociclador nas seguintes condições, descritas por Berçot; Poirel; Nordmann [22]: desnaturação inicial a 95 °C durante três minutos; seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C na etapa de desnatura o, 30 segundos a 54,5 °C na etapa de anelamento e 30 segundos a 72 °C na etapa de extensão; seguidos por uma única etapa de alongamento final a 72 °C durante cinco minutos. Para os genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* as condições foram as mesmas, exceto a temperatura de anelamento que para estes genes, foi de 52 °C, modificação realizada no laboratório onde esta pesquisa foi realizada. Durante a realização da PCR, foram inclusos controles positivos para cada um dos genes pesquisados e foi incluso um controle negativo, correspondente a um tubo contendo todos os componentes da mistura ao qual não foi adicionado DNA molde. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Esses produtos foram corados com Blue, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Resultados

Do total de 23 isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos, 11 (47,8%) isolados foram sensíveis a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina, e 12 (52,2%), foram resistentes a ambos antimicrobianos. Para estes 12 isolados, foram determinadas as CIMs de amicacina, gentamicina e tobramicina e os mesmos foram submetidos à PCR, para pesquisa dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.

Onze (91,7%) isolados apresentaram CIMs > 256 µg/mL de amicacina, 12 (100%) isolados apresentaram CIMs > 64 µg/mL de gentamicina e nove (75%) isolados apresentaram CIMs > 64 µg/mL de tobramicina. Os valores das CIMs dos antimicrobianos amicacina, gentamicina e tobramicina para os 12 isolados estão dispostos na Tabela 1.

O gene *armA* foi encontrado em todos os isolados 12 (100%). Seis (50%) isolados apresentaram apenas o gene *armA* e nos seis (50%) isolados restantes, foi verificada a coexistência dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC*. O gene *rmtD* não foi encontrado (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos isolados de *Acinetobacter* spp. com resistência concomitante à amicacina e à gentamicina quanto ao valor da CIM e à ocorrência dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.

Isolados	CIM (µg/mL)			Genes			
	AMI	GEN	TOB	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtD</i>
A1	>256	>64	32	+	-	-	-
A3	>256	>64	>64	+	+	+	-
A7	>256	>64	>64	+	-	-	-
A8	>256	>64	>64	+	-	-	-
A10	>256	>64	>64	+	-	-	-
A12	>256	>64	>64	+	+	+	-
A15	>256	>64	>64	+	-	-	-
A16	64	>64	>64	+	+	+	-
A21	>256	>64	16	+	-	-	-
A22	>256	>64	>64	+	+	+	-
A24	>256	>64	32	+	+	+	-
A29	>256	>64	>64	+	+	+	-

CIM: concentração inibitória mínima, AMI: amicacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina.

Discussão

No presente estudo, entre os 12 isolados de *Acinetobacter* spp., submetidos à pesquisa de genes codificadores de metilases RNAr 16S adquiridas, todos os 12 (100%) apresentaram o gene *armA*. De forma similar a este estudo, no trabalho realizado por El-Sayed-Ahmed *et al.* [23], no Egito, o gene *armA* foi encontrado em 94% (141/150) dos isolados clínicos de *A. baumannii* investigados, oriundos de três hospitais, sendo um deles oncológico.

Os genes *rmtB* e *rmtC* no presente estudo, foram encontrados nos mesmos isolados e em associação com o gene *armA* seis (50%). Diferentemente deste estudo, em um trabalho desenvolvido com 87 isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de quatro hospitais universitários em Tabriz, no Irã, os genes *rmtB* e *rmtC* não foram detectados, apenas o gene *armA* foi encontrado [24].

Observou-se no presente estudo, que os 12 (100%) isolados investigados, resistentes à amicacina e à gentamicina, também apresentaram resistência à tobramicina. Verificou-se CIMs $> 256 \mu\text{g/mL}$ de amicacina, $> 64 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina e $> 64 \mu\text{g/mL}$ de tobramicina para 11 (91,7%), 12 (100%) e nove (75%) isolados, respectivamente. Semelhantemente ao presente estudo, na Argélia, em uma análise realizada com 47 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem, 96,6% foram resistentes à amicacina. Entre estes, quatro (8,5%) isolados continham o gene *armA* e apresentaram alto nível de resistência aos aminoglicosídeos testados (amicacina, tobramicina e gentamicina), com CIMs $> 256 \mu\text{g/mL}$ de amicacina. No entanto, contrariamente ao presente estudo, os genes *rmtB* e *rmtC* não foram detectados [25].

Liu; Ling; Zhou [26], na China, pesquisaram genes codificadores de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtA-E* e *npmA*) em 60 isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes à amicacina e detectaram apenas o gene *armA* em 40 isolados (66,7%), os quais foram altamente (CIMs $\geq 256 \mu\text{g/mL}$) resistentes à gentamicina, amicacina e tobramicina, dados fenotípicos semelhantes aos do presente estudo. Em outra pesquisa executada também na China, a resistência de 20 isolados clínicos de *A. baumannii* multidroga resistentes (MDR) foi associada, por sua vez aos genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), encontradas em todos os isolados, e não aos genes codificadores de metilases RNAr 16S, os quais não foram detectados [19]. De forma similar ao presente estudo, foram detectadas CIMs $\geq 64 \mu\text{g/mL}$, $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ de amicacina, tobramicina e gentamicina, respectivamente e o gene *armA* foi encontrado em 90% (97/107) dos isolados de *A. baumannii* MDR pesquisados, provenientes de um hospital chinês [27].

Foi verificada, no presente estudo, uma maior frequência do gene *armA* 100% (12/12) quando comparada às dos genes *rmtB* 50% (6/12) e *rmtC* 50% (6/12). Também foi detectada, em isolados clínicos de *A. baumannii*, por Tada *et al.* [5], uma maior frequência do gene *armA*, quando comparada à do gene *rmtB*. O gene *rmtB* está distribuído mundialmente e tem sido encontrado mais comumente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* [20]. Diferentemente do presente estudo, entre os genes de metilases RNAr 16S investigados, apenas o gene *rmtB* foi encontrado em dois isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à amicacina, em uma pesquisa realizada na Bolívia [28]. No Brasil, Quiles *et al.* [10], encontraram o gene *armA* em dois isolados clínicos de *Enterobacter cloacae*, no Rio de Janeiro, e Fritsche *et al.* [8] detectaram o gene *rmtB* em um isolado clínico de *E. coli* e em dois de *Proteus mirabilis*, selecionados a partir de coleções de vigilância.

O gene *rmtC* tem sido mais comumente detectado em isolados de *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e está distribuído na Índia e no Reino Unido [20]. O presente estudo é o primeiro relato do gene *rmtC* na América do Sul. O gene *rmtD*, já encontrado no Brasil [7, 8, 13, 29], inclusive no Recife [11], em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, não foi detectado no presente estudo. O presente estudo representa também o primeiro relato dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no Brasil.

Como os genes de metilases RNAr 16S são cada vez mais identificados junto a outros genes de resistência, especialmente genes de carbapenemase [20], alguns estudos [19, 27] pesquisam estas enzimas apenas em isolados MDR. Porém no presente estudo, não foi feita esta restrição e foram pesquisados genes codificadores de metilases RNAr 16S em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, para evitar a subestimação do número de isolados portadores dos referidos genes. Tada *et al.* [30], no Japão, investigaram 49 isolados clínicos de *A. baumannii* MDR e encontraram *armA* em todos os isolados. No entanto estes autores ressaltam que, como eles se concentraram em isolados de *A. baumannii* MDR, mas não em isolados resistentes a aminoglicosídeos, um subconjunto de isolados *A. baumannii* resistentes aos aminoglicosídeos, como os produtores de *armA* sensíveis ao carbapenem pode ter sido perdido. Então os referidos autores afirmam a necessidade da continuação de pesquisas em isolados de *A. baumannii* resistentes aos aminoglicosídeos e não apenas em isolados MDR.

Portanto a ocorrência de genes codificadores de metilases RNAr 16S e o alto nível de resistência aos aminoglicosídeos testados relatados no presente estudo são preocupantes, principalmente pelo fato dos isolados de *Acinetobacter* spp. investigados terem sido provenientes de pacientes oncológicos, nos quais as taxas de infecções relacionadas às bactérias gram-negativas MDR está aumentando globalmente [1]. Vale salientar que a epidemiologia das metilases RNAr 16S codificadas por plasmídeos na América do Sul, tem sido pobremente investigada até agora [28], apontando a necessidade da realização de mais trabalhos deste tipo.

Conclusão

No presente estudo, foram encontrados três genes codificadores de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB* e *rmtC*) e alto nível de resistência aos aminoglicosídeos testados (amicacina, gentamicina e tobramicina) em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. Este estudo reforça a importância da realização de mais pesquisas sobre a resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S, devido às variações fenotípicas e genéticas que ocorrem de acordo

com os diferentes locais investigados. Os dados obtidos poderão auxiliar nas condutas terapêuticas e destacam a necessidade da elaboração de medidas, para controlar a disseminação do referido mecanismo de resistência, uma vez que o mesmo implica em alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, gerando uma maior restrição na terapia de infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR.

Referências

1. **Costa PO, Atta EH, Silva AR.** Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J)* 2015; 91: 435-441.
2. **Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O et al.** Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbial Drug Resistance* 2013; 19: 282-288.
3. **Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X et al.** Distribution of 16S rRNA methylases among different species of gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1349-1353.
4. **Corrêa LL, Witek MA, Zelinskaya N, Picão RC, Conn GL.** Heterologous expression and functional characterization of the exogenously acquired aminoglycoside resistance methyltransferases RmtD, RmtD2, and RmtG. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60: 699-702.
5. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N et al.** Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 251-256.
6. **Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H et al.** 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 642-646.
7. **Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL.** Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 852-856.
8. **Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES.** Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1843-1845.
9. **Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y.** Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2397-2400.

10. **Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A et al.** Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48: 174-177.
11. **Cavalcanti FL, Mirones CR, Paucar ER, Montes LA, Leal-Balbino TC et al.** Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110: 1003-1009.
12. **Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, Motta E, Nucleo E et al.** Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol* 2012; 61: 653-661.
13. **Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL.** High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3388-3390.
14. **Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC.** Emergence of 16S rRNA methylase RmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 490-491.
15. **Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ragnhildstveit E et al.** Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol* 2011; 60: 515-521.
16. **Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y.** Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 951-953.
17. **Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N et al.** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362: 1888-1893.
18. **Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K et al.** Dissemination of rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 305-312.
19. **Wen JT, Zhou Y, Yang L, Xu Y.** Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. *Genet Mol Res* 2014; 13: 3842-3849.
20. **Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y.** Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016; 30: 523-537.
21. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2016).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI supplement M100-S* 2016, 26 ed, v. 36, n. 1.

22. **Berçot B, Poirel L, Nordmann P.** Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 442-445.
23. **El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S et al.** High prevalence of *bla*_{NDM-1} carbapenemase-encoding gene and **16S rRNA** *armA* methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Egypt. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3602-3605.
24. **Sheikhalizadeh V, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, Rahmati-Yamchi M, Hasani A et al.** Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Chemother* 2017; 23: 74-79.
25. **Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D et al.** First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* 2014; 20: 696-701.
26. **Liu Z, Ling B, Zho, L.** Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother*; 27: 207-212.
27. **Xiao SZ, Han LZ, Chu HQ, Zhao L, Chen X et al.** Detection of aminoglycoside resistance related genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a single institute of Shanghai, China. *Panminerva Med* 2015; 57: 49-53.
28. **Bartoloni A, Sennati S, Di Maggio T, Mantella A, Riccobono E et al.** Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*_{CTX-M}, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *Int J Infect Dis* 2016; 43: 1-6.
29. **Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, Levy CE.** Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 2010; 14: 344-347.
30. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.** Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2916-2920.

5.2 Disseminação clonal de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. portadores dos genes de metilases RNAr 16S em um hospital oncológico do Recife, Brasil

O mecanismo de resistência mediado por metilases RNAr 16S gera alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e tem sido identificado em isolados clínicos de bacilos gram-negativos, como *Acinetobacter* spp. (Bakour et al., 2014; Wangkheimayum et al., 2017). Este microrganismo é um importante patógeno oportunista que causa infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), principalmente em pacientes em estado grave. (Bakour et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil clonal de 12 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes à amicacina, gentamicina e tobramicina e portadores dos genes de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB* e *rmtC*), provenientes de um hospital oncológico do Recife, Brasil, durante os anos de 2014 e 2015.

Entre o total de isolados, 11 (91,7%), 12 (100%) e nove (75%) isolados apresentaram respectivamente, concentrações inibitórias mínimas (CIMs) > 256 µg/mL de amicacina, > 64 µg/mL de gentamicina e > 64 µg/mL de tobramicina. O gene *armA* foi encontrado em todos os isolados 12 (100%) e em 6 (50%) (I3, I12, I16, I22, I24 e I29) houve a coexistência dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* (Pereira et al., dados não publicados).

Para a verificação da relação clonal entre os isolados, foi realizada a *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) (Ribot et al., 2001; Seifert et al., 2005). O DNA genômico dos isolados foi digerido com a enzima *SmaI* (*New England Biolabs*) e os fragmentos de DNA restritos foram separados através de eletroforese em sistema CHEF-DR III (*Bio Rad Laboratories*), em tampão TBE (0,5x). O marcador de peso molecular utilizado foi o *Lambda Ladder PFG Marker N0340S* (*New England Biolabs*). Após a coloração do gel com brometo de etídio (Figura 1), os padrões de banda foram analisados, através do *software BioNumerics* usando o método não ponderado de agrupamento aos pares com médias aritméticas (UPGMA), para a formação do dendrograma, e conforme os critérios de Tenover et al. (1995).

De acordo com os padrões de bandas observados, os isolados portadores dos genes de metilases RNAr 16S, apresentaram elevada similaridade genética (92%) e foi identificado um clone A, dividido nos subtipos A1, A2 e A3 (Figura 2). Observou-se que houve disseminação clonal na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e no setor de Hematologia do referido hospital, no período do estudo, visto que sete isolados (I3, I7, I10, I12, I21, I22 e I29) e cinco (I1, I8, I15, I16 e I24) foram provenientes destes setores, respectivamente.

Semelhantemente ao presente estudo, Yamane et al. (2007), após a realização da PFGE, verificaram que três isolados de *Acinetobacter baumannii* portadores do gene *armA* de um hospital no Japão, apresentaram o mesmo padrão de bandas e sugeriram uma provável transmissão hospitalar de *A. baumannii* portador de *armA*. Kim et al. (2008) e Strateva et al. (2011), como no presente estudo, também observaram uma elevada similaridade genética entre os isolados de *A. baumannii* portadores do gene *armA* e citaram a disseminação de um clone nos hospitais estudados pelos mesmos. Brigante et al. (2012) investigaram 21 isolados clínicos de *A. baumannii* portadores do gene *armA* e estes isolados, diferentemente do presente estudo, foram divididos em três clones distintos (A, B e C).

Acinetobacter spp. tornou-se um patógeno nosocomial emergente, particularmente em UTIs e frequentemente está associado a surtos. Muitas vezes está relacionado a materiais e equipamentos médicos contaminados em contato com água, bem como superfícies ambientais (Cornejo-Juárez et al., 2015). Em um estudo realizado na UTI pediátrica do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, considerando-se 101 casos de infecções por bactérias gram-negativas, o *A. baumannii* foi o patógeno que ocorreu com mais frequência 8 (17%) entre as bactérias gram-negativas multidroga resistentes (MDR) e entre as não MDR, o *A. baumannii* foi o segundo patógeno mais detectado 14 (26%) (Costa et al., 2015).

Diante do exposto, destaca-se a importância não apenas do estabelecimento, mas também do cumprimento de medidas que visem ao controle da disseminação, no ambiente hospitalar, de *Acinetobacter* spp., que pode apresentar resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S. Dessa forma, as consequentes IRAS, as quais contribuem para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade, poderão ser reduzidas.

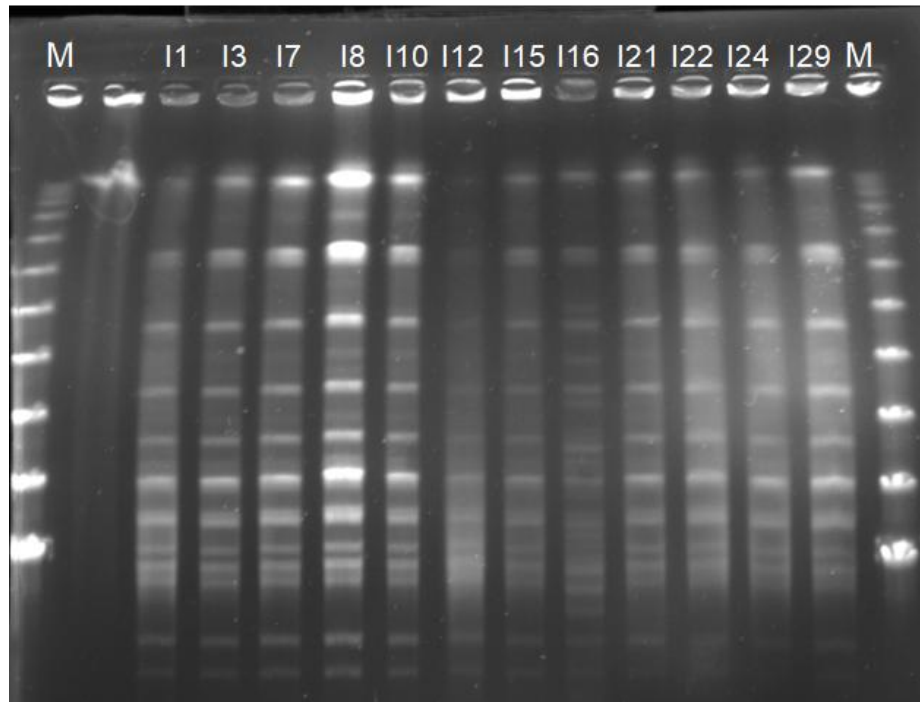


Figura 1. Gel de agarose corado com brometo de etídio e padrões de PFGE dos isolados analisados. PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*. M: marcador de peso molecular. I: isolado.

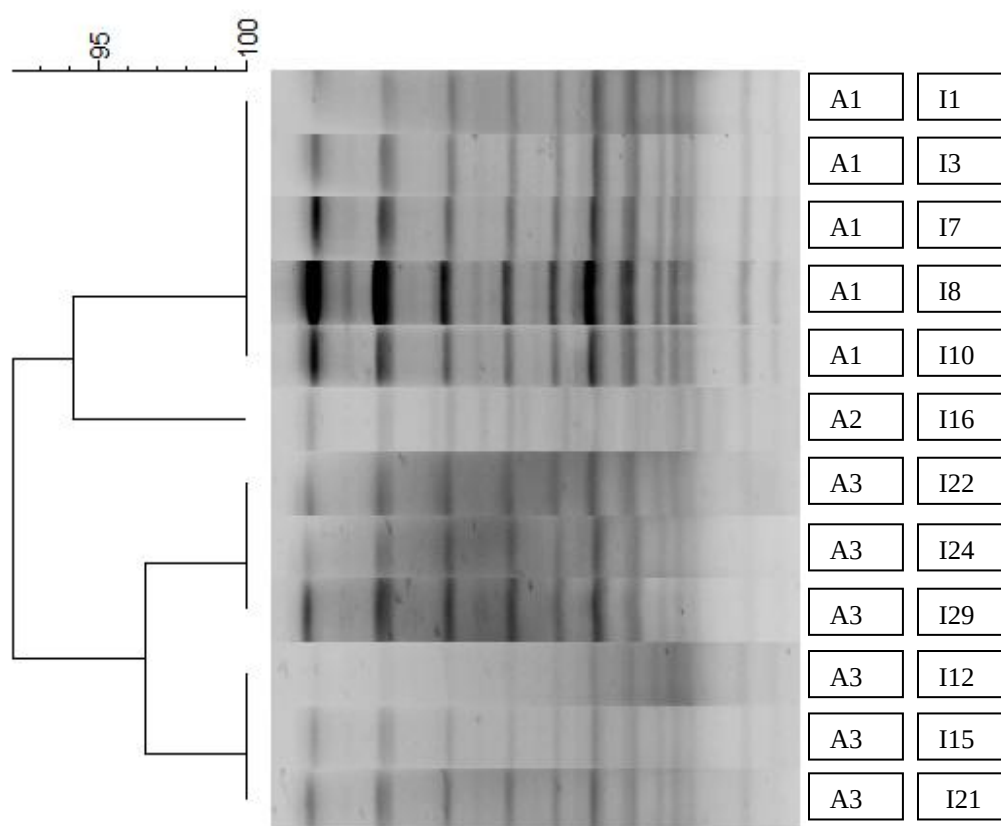


Figura 2. Padrões de PFGE dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes à amicacina, gentamicina e tobramicina e portadores de genes de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB* e *rmtC*). PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*. Coluna da esquerda: padrões de PFGE. Coluna da direita: isolados clínicos.

Referências

- Bakour, S. et al., 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother.* 20, 696-701.
- Brigante, G. et al., 2012. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol.* 61, 653-661.
- Cornejo-Juárez, P. et al., 2015. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 31, 31-34.
- Costa, P. O., et al., 2015. Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J).* 91, 435-441.

- Kim, J. W. et al., 2008. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. Clin Microbiol Infect. 14, 716-718.
- Ribot, E. M. et al., 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 39, 1889–1894.
- Seifert, H. et al., 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 43, 4328-4335.
- Strateva, T. et al., 2011. Emergence of 16S rRNA methylase-producing nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Bulgaria. J Chemother. 23, 374-375.
- Tenover, F. C. et al., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33, 2233-2239.
- Wangkheimayum, J. et al., 2017. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* within a tertiary referral hospital of northeast India. Antimicrob Agents Chemother. 61, 1-7.
- Yamane, K. et al., 2007. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. Emerg Infect Dis. 13, 642-646.

6 CONCLUSÕES

Nos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. analisados, foram encontrados três genes de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB* e *rmtC*), que ocorreram individualmente e em associação e foram detectadas também elevadas CIMs de amicacina, gentamicina e tobramicina para os referidos isolados

O gene *rmtD*, primeiro gene de metilase RNAr 16S detectado no Brasil e já reportado em Recife, não foi encontrado no presente estudo.

Verificou-se que os isolados apresentaram elevada similaridade genética (92%) e de acordo com a PFGE, foram classificados como clone A, que estava disseminado em dois setores do hospital (UTI e Hematologia).

O presente estudo é o primeiro relato do gene *rmtC* na América do Sul e representa também o primeiro relato dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC* em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., no Brasil.

É importante a realização de mais pesquisas sobre a resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S, devido às variações fenotípicas e genéticas que ocorrem, de acordo com os diferentes locais investigados.

São fundamentais a elaboração e o cumprimento de medidas que visem ao controle da disseminação da resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S, uma vez que o mesmo acarreta uma maior restrição na terapia de infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR. Através do controle da disseminação de *Acinetobacter* spp. no ambiente hospitalar, é possível reduzir as IRAS.

REFERÊNCIAS

- AGHAZADEH, M. *et al.* Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 282-288, 2013.
- BAKOUR, S. *et al.* First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 11, p. 696-701, 2014.
- BERÇOT, B.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 4, p. 442-445, 2011.
- BOGAERTS, P. *et al.* Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 459-464, 2007.
- BRIGANTE, G. *et al.* Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 653-661, 2012.
- BUENO, M. F. *et al.* 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**, v. 57, n. 5, p. 2397-2400, 2013.
- CASTRO, P. T. *et al.* Surgical-site infection risk in oncologic digestive surgery. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 109-115, 2011.
- CAVALCANTI, F. L. *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, 2015.
- CHO, Y. J. *et al.* Genetics basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 2, p. 185-190, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI supplement M100-S**, 26 ed, v. 36, n. 1, 2016.
- CORNEJO-JUÁREZ, P. *et al.* The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 31-34, 2015.
- CORRÊA, L. L. *et al.* Heterologous expression and functional characterization of the exogenously acquired aminoglycoside resistance methyltransferases RmtD, RmtD2, and RmtG. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 699-702, 2015.

COSTA, P. O.; ATTA, E. H.; SILVA, A. R. Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 91, n. 5, p. 435-441, 2015.

DOI, Y. *et al.* Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 852-856, 2007a.

DOI, Y. *et al.* High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3388-3390, 2007b.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Antimicrobial Resistance**, v. 45, n. 1, p. 88-94, 2007.

DOI, Y.; WACHINO, J. I.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.

FARIÑAS, M. C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 402-409, 2013.

FRITSCH, T. R. *et al.* Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1843-1845, 2008.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p. 106-119, 2008.

HANBERGER, H. *et al.* Rational use of aminoglycosides-review and recommendations by the Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA). **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 161-175, 2013.

JACKSON, J.; CHEN, C.; BUISING, K. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 516-525, 2013.

JÁCOME, P. R. L. A. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de hospitais públicos de Recife-PE. 99 f. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 140-150, 2006.

JIN, J. S. *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase RmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 490-491, 2009.

KARAH, N. *et al.* Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 515-521, 2011.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 2253-2254, 2010.

LEE, H. *et al.* Dissemination of rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. **Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 3, p. 305-312, 2006.

LINCOPAN, N. *et al.* Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 344-347, 2010.

LIU, Z.; LING, B.; ZHOU, L. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 207-212, 2015.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 477-497, 2005.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. F. *Acinetobacter* multirresistente-um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.

MIRANDA, R. P. A. *et al.* Neutropenia febril: experiência do serviço de oncologia pediátrica do centro de cirurgia pediátrica do hospital universitário da Universidade de Brasília. **Brasília Médica**, v. 39, n. 1/4, p. 16-21, 2002.

MOHAMMED, A. A. *et al.* The pattern of infection and antibiotics use in terminal cancer patients. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 2014.

MONTASSIER, E. *et al.* Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 841-850, 2013.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P.; BUDAK, A. Co-occurrence of carbapenem and aminoglycoside resistance genes among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Cracow, Poland. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 20, p. 9-14, 2014.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

OSMANI, A. H. *et al.* Outcomes of high risk patients with febrile neutropenia at a tertiary care Center. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 10, p. 2741-2745, 2017.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

POULIKAKOS, P.; TANSARLI, G. S.; FALAGAS, M. E. Combination antibiotic treatment versus monotherapy for multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Acinetobacter* infections: a systematic review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1675-1685, 2014.

QUILES, M. G. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174-177, 2015a.

QUILES, M. G. *et al.* Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 283, p. 1-8, 2015b.

RANI, F. M. *et al.* *Acinetobacter* spp. infections in Malaysia: a review of antimicrobial resistance trends, mechanisms and epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2479, p. 1-13, 2017.

SOUZA, V. B. *et al.* Alterações renais por aminoglicosídeos. **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 4/5, p. 131-135, 2008.

STRATEVA, T. *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase-producing nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Bulgaria. **Journal of Chemotherapy**, v. 23, n. 6, p. 374-375, 2011.

STRATEVA, T. *et al.* Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 307-310, 2012.

TADA, T. *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 251-256, 2013.

TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic gram-negative bacteria: an update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133-148, 2012.

WANGKHEIMAYUM, J. *et al.* Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* within a tertiary referral hospital of northeast India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1-7, 2017.

WEN, J. T. *et al.* Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3842-3849, 2014.

WONG, D. *et al.* Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

WONG, J. L. ; EVANS, S. E. Bacterial pneumonia in patients with cancer: novel risk factors and management. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 2, p. 263-277, 2017.

YAMANE, K. *et al.* Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 951-953, 2005.

YAMANE, K. *et al.* 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 642-646, 2007.

YOKOYAMA, K. *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1888-1893, 2003.

YU, Y.; ZHANG, Q.; DENG, Z. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. **F1000 Research (F1000 Faculty Rev)**, v. 6, n. 723, p. 1-9, 2017.

ZARRILLI, R. *et al.* Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 946-953, 2004.

ZEMBOWER, T. R. Epidemiology of infections in cancer patients. **Cancer Treatment and Research**, v. 161, p. 43-89, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* Distribution of 16S rRNA methylases among different species of gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 2010.

APÊNDICE A - ARTIGO 1 EM INGLÊS

Phenotypic and genetic characterization of aminoglycoside resistance mediated by 16S rRNA methylases of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from oncological hospital in Recife, Brazil

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira¹; Jailton Lobo da Costa Lima¹; Paulo Sérgio Ramos de Araújo^{1,2}; Maria Amélia Vieira Maciel¹

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil

²Instituto Aggeu Magalhães, Pernambuco, PE, Brasil

Mailing address:

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira

Departamento de Medicina Tropical/Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco-Brasil

CEP: 50670-901

Phone: (81) 2126-8526

E-mail: ju-biomed@hotmail.com

Resumo

Introdução: As metilases RNAr 16S geram alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, os quais são utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas, como o *Acinetobacter* spp. Alguns genes codificadores destas enzimas estão disseminados mundialmente, enquanto outros foram detectados em alguns países. **Objetivo:** caracterizar o perfil de susceptibilidade aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de um hospital oncológico do Recife, e dos resistentes a ambos antimicrobianos, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de amicacina, gentamicina e tobramicina e caracterizar o perfil genético (*armA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*). **Metodologia:** Foram selecionados isolados resistentes a ambos antimicrobianos, amicacina e gentamicina, através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton. Foi realizada microdiluição em caldo para determinar as CIMs dos antimicrobianos. Estes isolados foram submetidos à reação em cadeia da polimerase, para detecção dos genes. **Resultados:** Doze (52,2%) isolados foram resistentes à amicacina e à gentamicina. Entre estes, 11 (91,7%), 12 (100%) e nove (75%) isolados apresentaram respectivamente, CIMs > 256 µg/mL de amicacina, > 64 µg/mL de gentamicina e > 64 µg/mL de tobramicina. O gene *armA* foi encontrado em todos os isolados 12 (100%) e em 6 (50%) houve a coexistência dos genes *armA*, *rmtB* e *rmtC*. **Conclusão:** É necessária a elaboração de medidas que evitem a disseminação do referido mecanismo de resistência, em virtude da maior restrição terapêutica, ocasionada por ele, no caso de infecções por bactérias gram-negativas multidroga resistentes.

Palavras-chave: metilases RNAr 16S, aminoglicosídeos, *Acinetobacter* spp., Brasil, pacientes oncológicos.

Abstract

Introduction: The 16S rRNA methylases generate high level of resistance to aminoglycosides, which are used in the treatment of serious infections caused by gram-negative bacteria, as the *Acinetobacter* spp. Some of the genes encoding these enzymes are disseminated worldwide, while others were detected in some countries. **Objective:** to characterize the profile of susceptibility to aminoglycosides (amikacin and gentamicin) of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from an oncological hospital in Recife, and of resistant to both antimicrobials, determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of amikacin, gentamicin and tobramycin and to characterize the genetic profile (*armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD*). **Methodology:** were selected isolates resistant to both antimicrobials, amikacin and gentamicin, using the technique of disk diffusion on Mueller-Hinton agar. Broth microdilution was performed to determine the MICs of antimicrobials. The isolates were submitted to polymerase chain reaction for detection of genes. **Results:** Twelve (52,2%) isolates were resistant to amikacin and gentamicin. Among these, 11 (91,7%), 12 (100%) and nine (75%) isolates presented respectively, MICs > 256 µg/mL of amikacin, > 64 µg/mL of gentamicin and > 64 µg/mL of tobramycin. The *armA* gene was found in all 12 isolates (100%) and in 6 (50%) there was the coexistence of *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes. **Conclusion:** It is necessary to elaborate measures to prevent the spread of this mechanism of resistance, in virtue of the greater therapeutic restriction, caused by him, in case of infections by multidrug resistant gram-negative bacteria.

Keywords: 16S rRNA methylases, aminoglycosides, *Acinetobacter* spp., Brazil, oncologic patients.

Introduction

Patients with cancer and hematological malignancies present a greater risk of acquiring infections [1]. The antimicrobials aminoglycosides are widely used in clinical practice, especially for the treatment of serious infections caused by gram-negative bacteria, as *Acinetobacter* spp. [2, 3]. However, among several mechanisms of resistance, the production of enzymes acquired 16S rRNA methylases emerged as a significant threat to the clinical efficacy of these antimicrobials [4].

These enzymes modify the binding site of aminoglycosides in the 16S rRNA, conferring a high level of resistance to them. The modification prevalent in 16S rRNA in pathogenic bacteria is the methylation of the N7 position of the nucleotide G1405 (m⁷ G1405), with nine different enzymes, reported so far in clinical and veterinary isolates, encoded by genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* and *rmtH* [4].

Addressing the methylation of 16S rRNA, Tada *et al.* [5] conducted a study in two hospitals in Vietnam and found that among 101 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, from two Intensive Care Units (ICUs), 70 (71,3%) were highly resistant to amikacin, arbecacina and gentamycin, with minimum inhibitory concentrations (MICs) exceeding 1.024 mg/L. These authors also observed that among the 70 isolates, 61 presented the gene *armA* and the remaining nine, the gene *rmtB*. In a survey carried out with clinical isolates of gram-negative bacteria from 169 Japanese hospitals, all positive isolates to 16S rRNA methylases were highly resistant (MICs > 1.024 mg/L) to all aminoglycosides belonging to the group of 4,6-disubstituted deoxystreptamine [6]. In a study performed in Tehran, eight (26%) clinical isolates of *A. baumannii* highly resistant to amikacin (MICs $\geq$ 256 μ g/mL) were positive for the gene *armA* [2].

Doi *et al.*, [7] detected the methylase RmtD (*ribosomal methyltransferase* D) in an isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from a patient in a hospital in Brazil in 2005. According to these authors, this was the first identification of resistance to aminoglycosides mediated by a 16S rRNA methylase in South America. In Brazil, there are also reports of the occurrence of *rmtB* [8], *rmtG* [9] and *armA* [10] genes. In a study conducted with nine clinical isolates of *P. aeruginosa* resistant to carbapenem agents from three public hospitals in Recife, the *rmtD* gene was detected in an isolate which showed a high MIC of arbekacina (128 μ g/mL) [11].

In addition to works previously mentioned, there are other studies conducted in Brazil and in different countries [12-17] discussing about the profile of susceptibility to aminoglycosides and the occurrence of genes encoding for 16S rRNA methylases in gram-

negative bacteria, however the achievement of more studies is important, since these characteristics vary between hospitals [6, 18, 19]. It is worth noting that the prevalence data about the acquired 16S rRNA methylases remain relatively scarce [20].

Given the exposed above, the objective of this study was to characterize the profile of susceptibility to aminoglycosides (amikacin and gentamicin) of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from an oncological hospital in Recife, and of resistant to both antimicrobials, determine the MICs of amikacin, gentamicin and tobramycin and to characterize the genetic profile (*armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD*), in order to obtain local phenotypic and genetic data concerning the mechanism of resistance to aminoglycosides mediated by 16S rRNA methylases, which might be useful to stress the importance of implementing procedures, in order to control the spread of the same.

Methodology

Clinical isolates

A total of 23 clinical isolates were obtained from different samples from patients infected with *Acinetobacter* spp. from a oncological hospital in Recife, Brazil, during the years of 2014 and 2015 and were stored in glycerol (25%) -20 °C. To verify the purity of the colonies, were inoculated in Brain Heart Infusion (BHI) broth and after incubation at 37 °C for 48 hours, were plated on agar Eosin Methylene Blue (EMB). Afterwards were submitted to oxidase test and Triplice Sugar Iron (TSI).

Antimicrobial susceptibility profile

Initially, the antibiograms of 23 isolates were performed by disk diffusion technique in Mueller-Hinton agar, using the antimicrobials amikacin (30 µg) and gentamicin (10 µg), according to the standards established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [21].

Then, for the isolates that exhibited resistance concomitant to amikacin and gentamicin, were also determined the MICs of the antimicrobials amikacin, gentamicin and tobramycin, by broth microdilution, according with the standards established by the CLSI (2016). It was used *P. aeruginosa* ATCC 27853, in both techniques as control.

Extraction of total DNA

For the study of genes that encode 16S rRNA methylases, it was performed the extraction of total DNA of isolates that in the test of disk diffusion in Mueller-Hinton agar, presented concomitant resistance to amikacin and gentamicin. After the incubation of colonies in Luria Bertani (LB) broth, at 35 °C for 24 hours, the extraction was performed by Brazol kit (LGC-Biotechnology), according to the protocol provided by the manufacturer. The extracted DNA was quantified by spectrophotometry.

Polymerase chain reaction (PCR) conditions

During the performance of PCR of genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD* were used primers described by Berçot; Poirel; Nordmann [22]. For the detection of each of said genes, each amplification reaction was prepared in a final volume of 25 µL for each tube and included: 1 µL (10 ng) of total DNA, 1 µL (10 pmol) of each primer, 0,6 µL of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (8 mM), 5,0 µL of buffer (5x), 2,0 µL of MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL of *Taq* DNA Polymerase (5U). The amplification reactions to the *rmtD* gene, were performed in the thermocycler at the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94 °C in the step of denaturing, 30 seconds at 54,5 °C in step of annealing and 30 seconds at 72 °C in the step of extension; followed by a single step of extension end at 72 °C during 5 minutes. For the *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes the conditions were the same, except the temperature of the annealing that for these genes, was 52 °C, in accordance with the conditions described by Berçot; Poirel; Nordmann [22], plus modification carried out in the laboratory where this research was conducted. During the performance of PCR positive controls were included for each one of the genes surveyed and was included a negative control, corresponding to a tube containing all components of the mixture which has not been added to the DNA template. The PCR products were subjected to electrophoresis in 1,5% agarose gel in TBE buffer 0,5x. These products were stained with Blue, visualized in ultraviolet transilluminator and photodocumented.

Results

Of the total of 23 isolates of *Acinetobacter* spp. obtained, 11 (47,8%) isolates were sensitive to both antimicrobials, amikacin and gentamicin, and 12 (52,2%) were resistant to both antimicrobials. For these 12 isolates, it was determined the MIC of amikacin, gentamicin

and tobramycin and they were subjected to PCR for the detection of genes encoding for 16S rRNA methylases.

Eleven (91,7%) isolates presented MICs > 256 µg/mL of amikacin, 12 (100%) isolates presented MICs > 64 µg/mL of gentamicin and nine (75%) isolates presented MICs > 64 µg/mL of tobramycin. The values of the MICs of antimicrobials amikacin, gentamicin and tobramycin for 12 isolates are shown in Table 1.

The *armA* gene was found in all 12 isolates (100%). Six (50%) isolates showed only the gene *armA* and in six (50%) remaining isolates, it was verified the coexistence of *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes. The *rmtD* gene was not found (Table 1).

Table 1. Characterization of isolates of *Acinetobacter* spp. with concomitant resistance to amikacin and gentamicin regarding the value of the MIC and the occurrence of the 16S rRNA methylases genes.

Isolates	MIC (µg/mL)			Genes			
	AMI	GEN	TOB	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtD</i>
A1	>256	>64	32	+	-	-	-
A3	>256	>64	>64	+	+	+	-
A7	>256	>64	>64	+	-	-	-
A8	>256	>64	>64	+	-	-	-
A10	>256	>64	>64	+	-	-	-
A12	>256	>64	>64	+	+	+	-
A15	>256	>64	>64	+	-	-	-
A16	64	>64	>64	+	+	+	-
A21	>256	>64	16	+	-	-	-
A22	>256	>64	>64	+	+	+	-
A24	>256	>64	32	+	+	+	-
A29	>256	>64	>64	+	+	+	-

MIC: minimum inhibitory concentration, AMI: amikacin, GEN: gentamicin, TOB: tobramycin.

Discussion

In the present study, among the 12 isolates of *Acinetobacter* spp., submitted to research of genes encoding for acquired 16S rRNA methylases, all 12 (100%) presented the gene *armA*. In a manner similar to this study, in the work done by El-Sayed-Ahmed *et al.* [23], in Egypt, the *armA* gene was found in 94% (141/150) of clinical isolates of *A. baumannii* investigated from three hospitals, being one of them oncological.

The *rmtB* and *rmtC* genes in the present study, were found in the same isolates and in association with the *armA* gene six (50%). Unlike this study, in a study developed with 87 clinical isolates of *A. baumannii* from four university hospitals in Tabriz, Iran, *rmtB* and *rmtC* genes were not detected, only the *armA* gene was found [24].

It was observed in the present study, that the 12 (100%) isolates investigated, resistant to amikacin and gentamicin, also showed resistance to tobramycin. It was verified MICs > 256 $\mu\text{g/mL}$ of amikacin, > 64 $\mu\text{g/mL}$ of gentamicin and > 64 $\mu\text{g/mL}$ of tobramycin for 11(91,7%), 12 (100%) and nine (75%) isolates, respectively. Similarly to the present study, in Algeria, in an analysis conducted with 47 isolates of *A. baumannii* resistant to imipenem, 96,6% were resistant to amikacin. Among these, four (8,5%) isolates contained the *armA* gene and showed a high level of resistance to aminoglycosides tested (amikacin, tobramycin and gentamicin), with MICs > 256 $\mu\text{g/mL}$ of amikacin. However, contrary to the present study, the *rmtC* and *rmtB* genes were not detected [25].

Liu; Ling; Zhou [26], in China, investigated 16S rRNA methylases genes (*armA*, *rmtA-E* and *npmA*) in 60 clinical isolates of *A. baumannii* resistant to amikacin and detected only the gene *armA* in 40 isolates (66,7%), which were highly (MICs ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) resistant to gentamicin, tobramycin and amikacin, phenotypic data similar to found in the present study. In another study performed in China too, the resistance of 20 clinical isolates of multidrug resistant (MDR) *A. baumannii* was associated, in turn to the aminoglycoside modifying enzymes (AMES) genes, found in all isolates, and not to 16S rRNA methylases genes, which were not detected [19]. Similarly to the present study were detected MICs ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ and ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ of amikacin, tobramycin and gentamicin, respectively and the gene *armA* was found in 90% (97/107) of the isolates of MDR *A. baumannii* surveyed, from a Chinese hospital [27].

It was verified in this study, a higher frequency of the *armA* gene 100% (12/12) when compared to of the *rmtB* 50% (6/12) and *rmtC* 50% (6/12) genes. It was also detected in clinical isolates of *A. baumannii*, by Tada *et al.* [5], a higher frequency of the *armA* gene, when compared to the *rmtB* gene. The *rmtB* gene is distributed worldwide and has been found

most commonly in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [20]. Differently from the present study, among 16S rRNA methylases genes investigated, only the *rmtB* gene was found in two clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to amikacin, in a study carried out in Bolivia [28]. In Brazil, Quiles *et al.* [10] found the *armA* gene in two clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Rio de Janeiro, and Fritsche *et al.* [8] detected the *rmtB* gene in a clinical isolate of *E. coli* and two of *Proteus mirabilis*, selected from collections of surveillance.

The *rmtC* gene has been most commonly detected in isolates of *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* and is distributed in India and the United Kingdom [20]. The present study is the first report of the *rmtC* gene in South America. The *rmtD* gene, already found in Brazil [7, 8, 13, 29], including in Recife [11], in clinical isolates of *P. aeruginosa*, was not detected in the present study. The present study also represents the first report of *armA*, *rmtB* and *rmtC* genes in clinical isolates of *Acinetobacter* spp., in Brazil.

As the 16S rRNA methylases genes are increasingly identified with other resistance genes, especially genes of carbapenemase [20], some studies [19, 27] research these enzymes only in MDR isolates. However, in the present study, was not made this restriction and were investigated 16S rRNA methylases genes in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. resistant to aminoglycosides amikacin and gentamicin, to prevent underestimation of the number of isolated carrying these genes. Tada *et al.* [30], in Japan, investigated 49 clinical isolates of MDR *A. baumannii* and found *armA* in all isolates. However, these authors point out that, as they are concentrated in isolates of MDR *A. baumannii*, but not in isolates resistant to aminoglycosides, a subset of isolates of *A. baumannii* resistant to aminoglycosides, as producers of *armA* sensitive to carbapenem may have been lost. Then these authors affirm the need for the continuation of research in isolates of *A. baumannii* resistant to aminoglycosides and not only in MDR isolates.

Therefore, the occurrence of 16S rRNA methylases genes and the high level of resistance to aminoglycosides tested reported in the present study are alarming, mainly due to the fact that isolates of *Acinetobacter* spp. investigated have been derived from oncological patients, in which the rates of infections related to MDR gram-negative bacteria is increasing globally [1]. It is worth pointing out that the epidemiology of 16S rRNA methylases encoded by plasmids in South America, has been poorly investigated until now [28], pointing to the need of further work of this kind.

Conclusion

In the present study, were found three 16S rRNA methylases genes (*armA*, *rmtB* and *rmtC*) and high level of resistance to aminoglycosides tested (amikacin, gentamicin and tobramycin) in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. This study reinforces the importance of conducting more research on resistance to aminoglycosides mediated by 16S rRNA methylases, due to the phenotypic and genetic variations that occur in accordance with the different sites investigated. The data obtained can assist in therapeutic and highlight the need for the elaboration of measures to control the spread of this mechanism of resistance, since it implies a high level of resistance to aminoglycosides, generating a greater restriction in therapy for infections caused by MDR gram-negative bacteria.

Acknowledgments

The authors are grateful to the researcher from the Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Pernambuco, Brazil, PhD Danilo Elias Xavier, for providing the positive controls used for the execution of the PCRs of 16S rRNA methylases genes.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. **Costa PO, Atta EH, Silva AR.** Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J)* 2015; 91: 435-441.
2. **Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O et al.** Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbial Drug Resistance* 2013; 19: 282-288.
3. **Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X et al.** Distribution of 16S rRNA methylases among different species of gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1349-1353.
4. **Corrêa LL, Witek MA, Zelinskaya N, Picão RC, Conn GL.** Heterologous expression and functional characterization of the exogenously acquired aminoglycoside resistance methyltransferases RmtD, RmtD2, and RmtG. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60: 699-702.
5. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N et al.** Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 251-256.

6. **Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H et al.** 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 642-646.
7. **Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL.** Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 852-856.
8. **Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES.** Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1843-1845.
9. **Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y.** Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2397-2400.
10. **Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A et al.** Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48: 174-177.
11. **Cavalcanti FL, Mirones CR, Paucar ER, Montes LA, Leal-Balbino TC et al.** Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110: 1003-1009.
12. **Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, Motta E, Nucleo E et al.** Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol* 2012; 61: 653-661.
13. **Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL.** High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007b; 51: 3388-3390.
14. **Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC.** Emergence of 16S rRNA methylase RmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 490-491.
15. **Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ragnhildstveit E et al.** Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol* 2011; 60: 515-521.
16. **Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y.** Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 951-953.
17. **Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N et al.** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362: 1888-1893.

18. **Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K *et al.*** Dissemination of rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 305-312.
19. **Wen JT, Zhou Y, Yang L, Xu Y.** Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. *Genet Mol Res* 2014; 13: 3842-3849.
20. **Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y.** Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016; 30: 523-537.
21. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2016).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI supplement M100-S* 2016, 26 ed, v. 36, n. 1.
22. **Berçot B, Poirel L, Nordmann P.** Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 442-445.
23. **El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S *et al.*** High prevalence of *bla*_{NDM-1} carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA *armA* methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Egypt. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3602-3605.
24. **Sheikhalizadeh V, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, Rahmati-Yamchi M, Hasani A *et al.*** Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Chemother* 2017; 23: 74-79.
25. **Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D *et al.*** First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* 2014; 20: 696-701.
26. **Liu Z, Ling B, Zho, L.** Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother*; 27: 207-212.
27. **Xiao SZ, Han LZ, Chu HQ, Zhao L, Chen X *et al.*** Detection of aminoglycoside resistance related genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a single institute of Shanghai, China. *Panminerva Med* 2015; 57: 49-53.
28. **Bartoloni A, Sennati S, Di Maggio T, Mantella A, Riccobono E *et al.*** Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*_{CTX-M}, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *Int J Infect Dis* 2016; 43: 1-6.
29. **Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, Levy CE.** Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 2010; 14: 344-347.

30. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.** Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2916-2920.

APÊNDICE B - ARTIGO 2 EM INGLÊS

Clonal dissemination of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. carrying genes of 16S rRNA methylases in an oncological hospital in Recife, Brazil

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira¹; Carlos Alberto das Neves de Andrade²; Paulo Sérgio Ramos de Araújo^{1,2}; Maria Amélia Vieira Maciel¹

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil

²Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, PE, Brasil

Mailing address:

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira

Departamento de Medicina Tropical/Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

CEP: 50670-901

Phone: (81) 2126-8526

E-mail: ju-biomed@hotmail.com

Resumo: O objetivo deste estudo foi determinar o perfil clonal de 12 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes à ampicilina, gentamicina e tobramicina e portadores dos genes de metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB* e *rmtC*), provenientes de um hospital oncológico do Recife, Brasil, durante os anos de 2014 e 2015. Conforme os padrões de bandas gerados pela *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), os 12 isolados apresentaram elevada similaridade genética (92%) e foram classificados como clone A, o mesmo foi disseminado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e no setor de Hematologia do referido hospital. Esses resultados demonstram a importância do estabelecimento e do cumprimento de medidas, que visem ao controle da disseminação, no ambiente hospitalar, de *Acinetobacter* spp., que pode apresentar resistência aos aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp., metilases RNAr 16S, aminoglicosídeos, PFGE, clone.

Abstract: The objective of this study was to determine the clonal profile of 12 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. resistant to amikacin, gentamicin and tobramycin and carrying genes of 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB* and *rmtC*), from an oncological hospital in Recife, Brazil, during the years of 2014 and 2015. The patterns of bands generated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), the 12 isolates showed high genetic similarity (92%) and were classified as clone A, the same was disseminated on Intensive Care Unit (ICU) and in the sector of Hematology of said hospital. These results demonstrate the importance of the establishment and enforcement of measures that aim to control the dissemination, in the hospital environment, of *Acinetobacter* spp., which can present resistance to aminoglycosides mediated by 16S rRNA methylases.

Keywords: *Acinetobacter* spp., 16S rRNA methylases, aminoglycosides, PFGE, clone.

The mechanism of resistance mediated by 16S rRNA methylases generates a high level of resistance to aminoglycosides and has been identified in clinical isolates of gram-negative bacilli, as *Acinetobacter* spp. (Bakour et al., 2014; Wangkheimayum et al., 2017). This microorganism is an important opportunistic pathogen that causes Healthcare-associated Infections (HAI), especially in critically ill patients (Bakour et al., 2014).

The objective of this study was to determine the clonal profile of 12 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. resistant to amikacin, gentamicin and tobramycin and carrying genes of 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB* and *rmtC*), from an oncological hospital in Recife, Brazil, during the years of 2014 and 2015.

Among the total of isolates, 11 (91,7%), 12 (100%) and nine (75%) isolates presented respectively, minimal inhibitory concentration (MICs) $> 256 \mu\text{g/mL}$ of amikacin, $> 64 \mu\text{g/mL}$ of gentamicin and $> 64 \mu\text{g/mL}$ of tobramycin. The gene *armA* was found in all 12 isolates (100%) and in 6 (50%) (I3, I12, I16, I22, I24 and I29) there was the coexistence of genes *armA*, *rmtB* and *rmtC* (Pereira et al., unpublished data).

For the verification of the clonal relationship among isolates, was performed the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Ribot et al., 2001; Seifert et al., 2005). The genomic DNA of the isolates was digested with the enzyme *SmaI* (New England Biolabs) and restricted DNA fragments were separated by electrophoresis in CHEF-DR III system (Bio Rad Laboratories), in TBE buffer (0,5x). The molecular weight marker used was the Lambda Ladder PFG Marker N0340S (New England Biolabs). After the staining of the gel with ethidium bromide (Figure 1), the band patterns were analyzed, through the BioNumerics software using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA), for the formation of the dendrogram, and according to the criteria of Tenover et al. (1995).

According to the patterns of bands observed, the isolates carrying the genes of 16S rRNA methylases, showed high genetic similarity (92%) and was identified a clone A, divided into subtypes A1, A2 and A3 (Figure 2). It was observed that there was a clonal dissemination in the Intensive Care Unit (ICU) and in the sector of Hematology of said hospital, during the period of study, since seven isolates (I3, I7, I10, I12, I21, I22 and I29) and five (I1, I8, I15, I16 and I24) were from these sectors, respectively.

Similarly to the present study, Yamane et al. (2007), after the performance of the PFGE, found that three isolates of *Acinetobacter baumannii* carrying the gene *armA*, of a hospital in Japan, showed the same pattern of bands and suggested a probable nosocomial transmission of *A. baumannii* carrying of *armA*. Kim et al. (2008) and Strateva et al. (2011), as in the present study, also observed a high genetic similarity between the isolates of *A.*

baumannii carrying the gene *armA* and cited the spread of a clone in the hospitals studied by them. Brigante et al. (2012) investigated 21 clinical isolates of *A. baumannii* carrying the gene *armA* and these isolates, differently from the present study, were divided into three distinct clones (A, B and C).

Acinetobacter spp. became an emerging nosocomial pathogen, particularly in ICUs and is often associated with outbreaks. Many times is related to contaminated medical equipment and materials in contact with water, as well as environmental surfaces (Cornejo-Juárez, et al. 2015). In a study performed in the pediatric ICU at the National Institute of Cancer (INCA), in Brazil, considering 101 cases of infection by gram-negative bacteria, *A. baumannii* was the pathogen that occurred with more frequency eight (17%) among the multidrug resistant (MDR) gram-negative bacteria and between the non MDR, *A. baumannii* was the second most detected pathogen 14 (26%) (Costa et al., 2015).

Given the exposed above, it stands out the importance not only of the establishment, but also the enforcement of measures that aim to control the dissemination, in the hospital environment, of *Acinetobacter* spp., which can present resistance to aminoglycosides mediated by 16S rRNA methylases. That way, the consequent HAI, which contribute for the increase in the rates of morbidity and mortality, can be avoided.

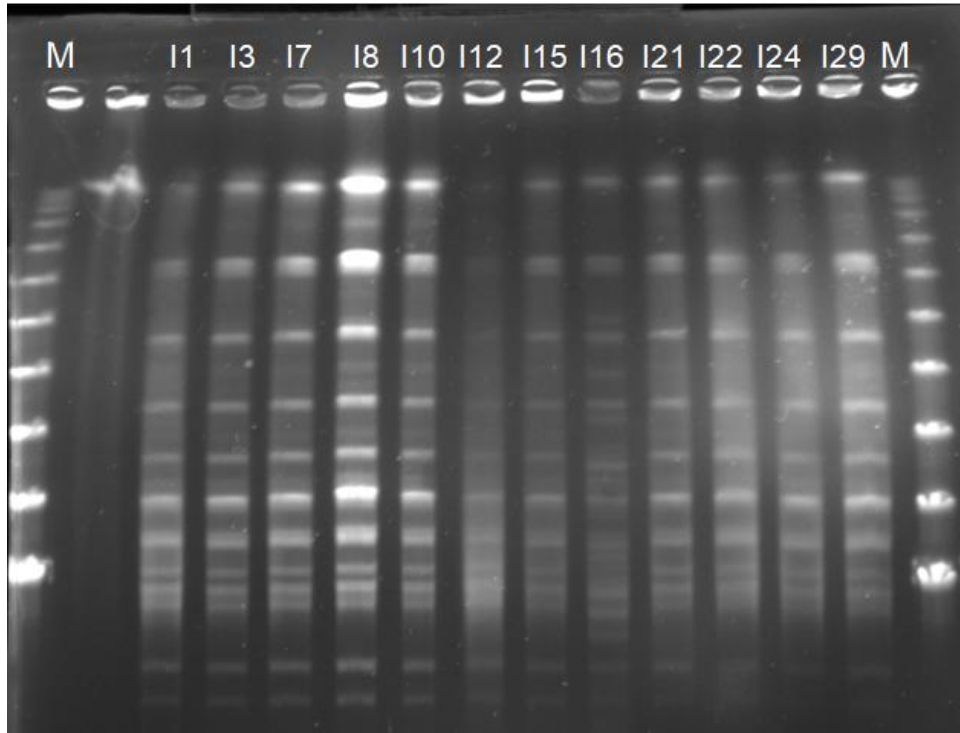


Figure 1. Agarose gel stained with ethidium bromide and PFGE patterns of the isolates analyzed. PFGE: pulsed-field gel electrophoresis. M: molecular weight marker. I: isolate.

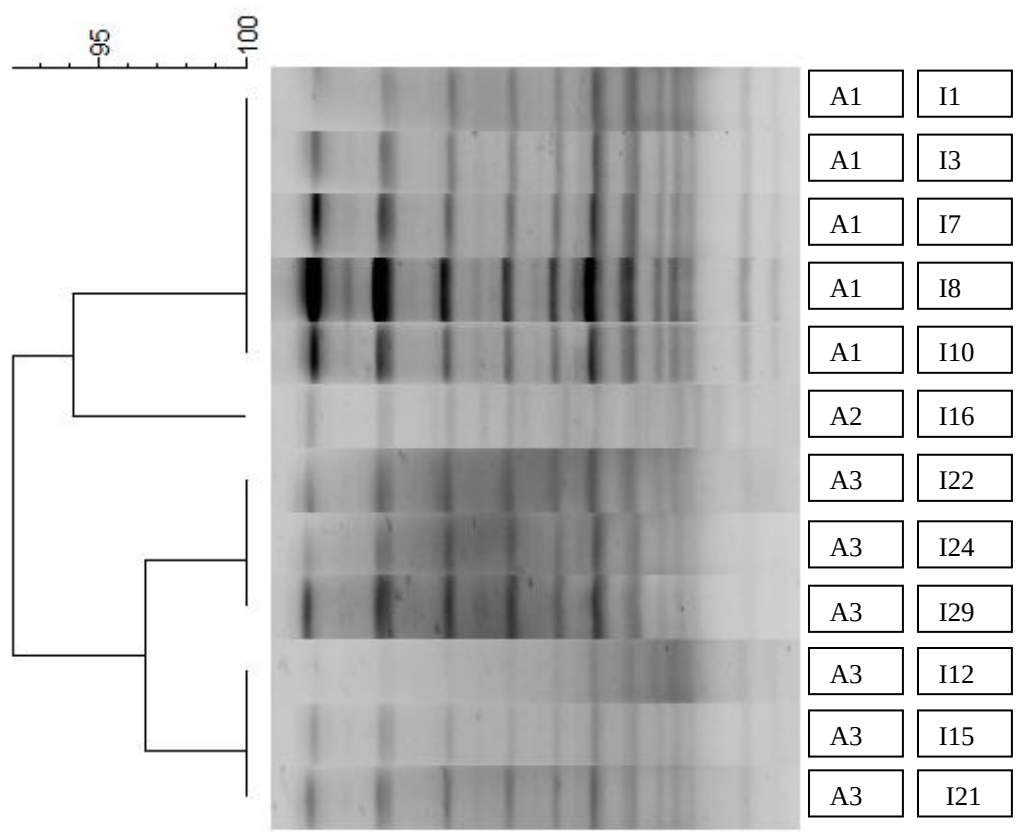


Figure 2. PFGE patterns of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. resistant to amikacin, gentamicin and tobramycin and carrying of genes of 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB* and *rmtC*). PFGE: pulsed-field gel electrophoresis. Left column: PFGE patterns. Right column: clinical isolates.

Acknowledgments

The authors are grateful to the researcher from the Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Pernambuco, Brazil, PhD Danilo Elias Xavier, by operational support offered during the realization of this study.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Bakour, S. et al., 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-β-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. J Infect Chemother. 20, 696-701.

- Brigante, G. et al., 2012. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol.* 61, 653-661.
- Cornejo-Juárez, P. et al., 2015. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 31, 31-34.
- Costa, P. O., et al., 2015. Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J).* 91, 435-441.
- Kim, J. W. et al., 2008. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect.* 14, 716-718.
- Ribot, E. M. et al., 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 39, 1889-1894.
- Seifert, H. et al., 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 43, 4328-4335.
- Strateva, T. et al., 2011. Emergence of 16S rRNA methylase-producing nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Bulgaria. *J Chemother.* 23, 374-375.
- Tenover, F. C. et al., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Wangkheimayum, J. et al., 2017. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* within a tertiary referral hospital of northeast India. *Antimicrob Agents Chemother.* 61, 1-7.
- Yamane, K. et al., 2007. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis.* 13, 642-646.

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 AO JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY

Journal of Medical Microbiology

**Phenotypic and genetic characterization of aminoglycoside resistance mediated by
16S rRNA methylases of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from oncological
hospital in Recife, Brazil**
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JMM-D-18-00106
Full Title:	Phenotypic and genetic characterization of aminoglycoside resistance mediated by 16S rRNA methylases of clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> spp. from oncological hospital in Recife, Brazil
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Antimicrobial Resistance
Keywords:	16S rRNA methylases; aminoglycosides; <i>Acinetobacter</i> spp.; Brazil; oncologic patients
Corresponding Author:	Jussýegles Niedja da Paz Pereira, Dra Universidade Federal de Pernambuco BRAZIL
First Author:	Jussýegles Niedja da Paz Pereira, Dra
Order of Authors:	Jussýegles Niedja da Paz Pereira, Dra Jailton Lima Paulo Araújo Maria Amélia Maciel
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Introduction: The 16S rRNA methylases generate high level of resistance to aminoglycosides, which are used in the treatment of serious infections caused by Gram-negative bacteria, as the <i>Acinetobacter</i> spp. Some of the genes encoding these enzymes are disseminated worldwide, while others were detected in some countries. Objective: to characterize the profile of susceptibility to aminoglycosides (amikacin, gentamicina and tobramycin) of clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> spp. from an oncological hospital in Recife, and of resistant to both antimicrobials, determine the minimum inhibitory concentration of amikacin, gentamicin and tobramycin and to characterize the genetic profile (<i>armA</i>, <i>rmtB</i>, <i>rmtC</i> and <i>rmtD</i>). Methodology: were selected isolates resistant to both antimicrobials, amikacin and gentamicin, using the technique of disk diffusion on Mueller-Hinton agar. Broth microdilution was performed to determine the MICs of antimicrobials. The isolates were submitted to polymerase chain reaction for detection of genes. Results: Twelve (52,2%) isolates were resistant to amikacin and gentamicin. Among these, 11 (91,7%), 12 (100%) and nine (75%) isolates presented respectively, CIMs > 256 µg/ml of amikacin, > 64 µg/ml of gentamicin and > 64 µg/ml of tobramycin. The <i>armA</i> gene was found in all 12 isolates (100%) and in 6 (50%) there was the coexistence of <i>armA</i>, <i>rmtB</i> and <i>rmtC</i> genes. Conclusion: It is necessary to elaborate measures to prevent the spread of this mechanism of resistance, in virtue of the greater therapeutic restriction, caused by him, in case of infections by multidrug resistant Gram-negative bacteria.

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2 AO INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION

Elsevier Editorial System(tm) for Infection,
Genetics and Evolution
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Clonal dissemination of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. carrying genes of 16S rRNA methylases in an oncological hospital in Recife, Brazil

Article Type: Short communication

Keywords: *Acinetobacter* spp.; 16S rRNA methylases; aminoglycosides; PFGE; clone.

Corresponding Author: Dr. Jussyêgles Niedja da Paz Pereira, MSc.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Jussyêgles Niedja da Paz Pereira, MSc.

Order of Authors: Jussyêgles Niedja da Paz Pereira, MSc.; Carlos Andrade; Paulo Araújo, Dr; Maria Amélia Maciel

Abstract: The objective of this study was to determine the clonal profile of 12 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. resistant to amikacin, gentamicine and tobramycin and carrying genes of 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB* and *rmtC*), from an oncological hospital in Recife, Brazil, during the years of 2014 and 2015. As the patterns of bands generated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), the 12 isolates showed high genetic similarity (92%) and were classified as the clone, the same was disseminated on Intensive Care Unit (ICU) and in the sector of hematology of said hospital. These results demonstrate the importance of the establishment and enforcement of measures that aim to control the dissemination, in the hospital environment, of *Acinetobacter* spp., which can present resistance to aminoglycosides mediated by 16S rRNA methylases.

Suggested Reviewers: Renata Picão
renata.picao@micro.ufrj.br

Helio Sader
helio-sader@jmlabs.com

Beatriz Moreira
bmeurer@micro.ufrj.br

Sergio Fracalanza
fracalanza@micro.ufrj.br