



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOSÉ LUCIANO BRAINER DE FARIAS FILHO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE OXACILINASES E CARBAPENEMASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp PROCEDENTES DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO
DE RECIFE-PERNAMBUCO**

Recife

2022

JOSÉ LUCIANO BRAINER DE FARIAS FILHO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE OXACILINASES E CARBAPENEMASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp PROCEDENTES DE UM HOSPITAL TERCIÁRIO
DE RECIFE-PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Área Concentração Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

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

Coorientador: Prof^o. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho

Recife

2022

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

F224d Farias Filho, José Luciano Brainer de.
 Detecção molecular de oxacilinas e carbapenemases em isolados de
Acinetobacter Spp Procedentes de um hospital terciário de Recife - Pernambuco /
José Luciano Brainer de Farias Filho – 2022.
 45 p.

 Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel
 Coorientador: Carlos Roberto Weber Sobrinho
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife,
2022.
 Inclui referências.

 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. *Beta-lactamases*. 3. Resistência Microbiana a
Medicamentos. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 164)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

JOSÉ LUCIANO BRAINER DE FARIAS FILHO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE OXACILINASES E CARBAPENEMASES EM
ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp PROCEDENTES DE UM HOSPITAL
TERCIÁRIO DE RECIFE - PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Área de Concentração Medicina Tropical, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 23/02/2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Ana Beatriz Sotero Siqueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Valdemir Vicente da Silva Júnior (Examinador Externo)
Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE)

Dedico esta dissertação aos meus pais, Ailma Cavalcanti e Luciano Brainer, meus maiores e melhores orientadores de vida, por todo amor e dedicação na minha educação, minha irmã Andrezza e sobrinha, Ana Cecília, por todo incentivo constante e motivação, por fim, a minha esposa Juliana Gonçalves, por todo seu amor, compreensão, apoio e dedicação para conclusão deste ciclo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida, sua infinita bondade e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos, nos quais me deparei ao longo desta trajetória;

Aos meus pais, Ailma Cavalcanti e Luciano Brainer, pelo seu amor, carinho, dedicação e incentivo em toda a minha vida;

A minha irmã, Andrezza, minha sobrinha, Ana Cecília, por todo apoio, motivação e compreensão quando precisei estar ausente;

A minha esposa, Juliana Gonçalves, por todo seu amor, carinho, incentivo, compreensão e suporte nos momentos mais atribulados e por estar sempre ao meu lado;

Aos meus avós, Adélia, Sabastião e Wagner (*in memoriam*), minha avó Sevi, por todo aprendizado, dedicação e amor;

Aos meus tios e primos, por toda motivação e apoio incondicional durante toda minha trajetória;

A minha orientadora Prof^a. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel, por toda paciência e compreensão, pelo suporte e orientação que me foram prestados no desenvolvimento da pesquisa;

Meu coorientador, Prof^o. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho, por sua amizade, apoio e incentivos constantes para o meu desenvolvimento pessoal e profissional;

Aos meus colegas de laboratórios e grupo de pesquisa, Dr. Jailton Lobo, Sergio Dias, Adriana Marques e Aline Albuquerque, por todos os momentos de aprendizado, suporte, companherismos e dedicação;

Aos colaboradores, Prof^o. Dr. Danilo Elias Xavier, Dr. Igor Vasconcelos Rocha (colega de graduação), por disponibilizar isolados controles e seus conhecimentos para desenvolver parte dos experimentos;

Aos colegas de mestrado, pelos momentos de aprendizado e por todos os momentos divertidos durante as disciplinas;

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, pelos ensinamentos e contribuições na minha formação;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

O surgimento de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos dentro do ambiente hospitalar por vezes está associada a enzimas β -lactamases (oxacilinases e carbapenemases). Por esta razão, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de genes de oxacilinases (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}) e carbapenemases do tipo KPC, metalo- β -lactamases, (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}), além de analisar o perfil clonal dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados durante os anos de 2018 e 2019. Foram analisados 35 isolados de *Acinetobacter* spp., destes 33 isolados bacterianos foram multidroga resistentes inclusive aos carbapenêmicos. Em relação à detecção genética das enzimas oxacilinases, as frequências das oxacilinases OXA-51 (85,71%), OXA-143 (77,4%) e OXA-23 (14,28%) encontradas no estudo, destacando que OXA-143 foi a segunda mais frequente, sendo este padrão diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo. O gene *bla*_{VIM} (8,57%) apresentou frequência baixa nos isolados *Acinetobacter* spp. estudados e o gene *bla*_{KPC} foi detectado em 5,71%. De acordo com os resultados, a ERIC-PCR mostrou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. avaliados, com similaridade variando de 24% a 100%, sendo identificados dois clones. A OXA-143 foi a segunda oxacilinase mais frequente nos isolados estudados, diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo. Concluindo que os resultados deste estudo descrevem um perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos que está relacionado à resistência bacteriana aos carbapenêmicos nos 35 isolados bacterianos de *Acinetobacter* spp. Quanto à detecção genética das oxacilinases OXA-51, OXA-143 e OXA-23 foram as mais frequentes no estudo, destaque para OXA-143 apresentou um padrão diferente dos dados prévios em outros estudos. Em relação à ocorrência do gene *bla*_{VIM} ocorreu com frequência baixa nos isolados *Acinetobacter* spp. pesquisados, enquanto não foram detectados os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP}. A detecção da β -lactamases KPC neste estudo foi detectada uma frequência de 5,71%, considerado índice baixo quando comparada a outros estudos no Brasil. A análise filogenética apresentou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., sendo identificados apenas dois clones.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; beta-lactamases; resistência microbiana a medicamentos.

ABSTRACT

The emergence of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in the hospital environment is sometimes associated with β -lactamases enzymes (oxacylinases and carbapenemases). For this reason, the aim of this study was to evaluate the occurrence of oxacylinase genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like}) and carbapenemases in the KPC type, metallo- β -lactamases, (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}), in addition to analyzing the clonal profile of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from patients from a tertiary hospital in Recife-PE, collected during the years 2018 and 2019. 35 *Acinetobacter* spp. isolates were analyzed, of these 33 bacterial isolates were multidrug resistant, including carbapenems. Regarding the genetic detection of oxacylinase enzymes, the frequencies of oxacylinases OXA-51 (85,71%), OXA-143(77,4%) and OXA-23(14,28%) found in the study, highlighting that OXA-143 was the second most frequent, which is different from previous data in other studies in Brazil and worldwide. The *bla*_{VIM} gene (8,57%) showed a low frequency in the *Acinetobacter* spp. isolates studied and the *bla*_{KPC} gene was detected in 5,71%. According to the results, ERIC-PCR showed genetic diversity and heterogeneity among the 35 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. evaluated, with similarity ranging from 24% to 100%, and two clones were identified. OXA-143 was the second most frequent oxacillinase in the isolates studied, different from previous data in other studies in Brazil and worldwide. The results of this study describe an antimicrobial susceptibility profile that is related to bacterial resistance to carbapenems in the 35 bacterial isolates of *Acinetobacter* spp. As for the genetic detection of oxacillinases OXA-51, OXA-143 and OXA-23 were the most frequent in the study, emphasis on OXA-143 showed a pattern different from previous data in other studies. Regarding the occurrence of the *bla*_{VIM} gene, it occurred with low frequency in the *Acinetobacter* spp. isolates investigated, while the *bla*_{SPM} and *bla*_{IMP} genes were not detected. The detection of KPC β -lactamases in this study was detected at a frequency of 5,71%, considered a low rate when compared to other studies in the Brazil. As for the phylogenetic analysis, it showed genetic diversity and heterogeneity among the 35 clinical isolates of *Acinetobacter* spp., with only two clones being identified.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; beta-lactamases; microbial drug resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1.	<i>Acinetobacter</i> spp.....	11
2.2.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12
2.3.	RESISTÊNCIA BACTERIANA	12
2.3.1.	Mecanismos enzimáticos	13
2.3.2.	Permeabilidade da membrana	14
2.3.3.	Bomba de efluxo	14
2.4.	β -LACTAMASES.....	14
2.5.	CARBAPENEMASES.....	15
2.6.	ENZIMA KPC	16
3	OBJETIVOS.....	18
3.1.	OBJETIVO GERAL	18
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4	METODOLOGIA	19
4.1.	DESENHO DO ESTUDO.....	19
4.2.	LOCAL DO ESTUDO	19
4.3.	POPULAÇÃO DO ESTUDO	19
4.4.	TAMANHO AMOSTRAL	19
4.5.	ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	20
4.6.	ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Acinetobacter</i> spp.....	20
4.6.1.	Extração do DNA total.....	20
4.6.2.	Deteção dos genes de oxacilinasas	21
4.6.3.	Deteção dos genes relacionados à produção de metalo- β -lactamases (M β L).....	23
4.6.4.	Deteção de genes <i>bla</i> _{KPC}	25
4.6.5.	ERIC-PCR.....	25
4.6.6.	Deteção das bandas de DNA	26
5	RESULTADOS - ARTIGO – DETECÇÃO MOLECULAR DE OXACILINASES E CARBAPENEMASES EM ISOLADOS DE <i>Acinetobacter</i> spp. PROCEDENTES DE UM HOSPITAL DE RECIFE - PE	27
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais tem sido um dos mais importantes riscos aos pacientes hospitalizados. Com o advento de novas tecnologias relacionadas à identificação de microrganismos, além da constante ampliação das terapias antimicrobianas, é crescente o aparecimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos disponíveis. Neste contexto, destaca-se o gênero *Acinetobacter*, bactéria por vezes presente em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), principalmente em pacientes com internações com duração prolongada, com uso de dispositivos invasivos, gravemente enfermos e imunossuprimidos. (Gian, D. C.; Marcelo, C. A., 2016)

Isolados de *Acinetobacter* spp., principalmente *Acinetobacter baumannii*, têm acumulado resistência a uma ampla gama de antibióticos, tais como penicilinas, cefalosporinas e quinolonas. Assim, a classe antimicrobiana dos carbapenêmicos por vezes é a terapia de escolha para os quadros infecciosos mais graves relacionados a esse gênero. (Rocha, 2017)

Os genes de resistência do tipo OXA carbapenemases em isolados de *Acinetobacter* spp. são os principais responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em todo o mundo (Opazo et al., 2012; Kobs et al., 2016). No Brasil, existem relatos de altas taxas de resistência aos carbapenêmicos. Neste contexto, o presente estudo propõe-se avaliar a frequência destes genes e resistências as oxacilinas em isolados hospitalares de *Acinetobacter* spp. de hospital terciário de Recife-PE.

Aliramezani et al., 2016 verificaram *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos associados à oxacilinas, tendo identificado os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-58-like}. O estudo limitou-se a identificar apenas os três genes tipo OXA citados. Sendo também de importante interesse a avaliação da presença do gene *bla*_{OXA-51-like}, o qual não foi inserido no estudo. O gene *bla*_{OXA-51-like} é intrínseco *A. baumannii*, desta forma inferir como característica a confirmação e identificação molecular desta bactéria.

Biglari et al., 2015 em seu estudo com *A. baumannii* encontraram quatro subgrupos de carbapenemases que são adquiridas, dentre elas estão OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-143. Ainda que tenha abrangido um maior numero de genes, tal estudo não evidenciou se os genes conferiam uma potencial resistência aos isolados.

Desta forma, faz-se necessário a realização de estudo sobre a frequência em que são identificados os genes OXA, englobando de forma mais abrangente as suas variações genéticas e confirmar a resistência aos carbapenêmicos.

Este estudo tem por objetivo avaliar o perfil clonal dos isolados, verificar a ocorrência dos genes codificantes que conferem resistência aos carbapenêmicos, as carbapenemases OXA, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}, bem como avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter* spp de hospital terciário de Recife-PE, coletados durante os anos de 2018 e 2019.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Acinetobacter* spp.

A taxonomia do *Acinetobacter* por muito tempo esteve indefinida. Foi descrita a primeira vez em 1911, sendo inicialmente denominada como *Micrococcus calcoaceticus*, depois recebendo diferentes nomenclaturas, como *Bacterium anitratum* e *Achoromobacter*. Em 1950, após estudo sobre as características do gênero, foi definido e aceito como *Acinetobacter* spp. (Henriksen, 1973; Dijkshoorn L.; Nemec A.; Seifert H. 2007)

O gênero *Acinetobacter* é composto por bactérias saprófitas ubíqua, encontradas na natureza, como solo e água, e no ambiente hospitalar: em equipamentos de respiração mecânica, superfícies secas e úmidas, podendo apresentar pacientes colonizados ou infectados. Nos indivíduos saudáveis, podem ser isolada na pele, orofaringe, fezes e em outras secreções. São cocobacilos gram negativos, aeróbios estritos, não fermentadores de carboidratos, não formadores esporos, com motilidade negativa e teste de oxidase negativa. Quando semeada em meio ágar MacConkey, as colônias apresentam-se em uma tonalidade levemente rosa, enquanto que no ágar sangue as colônias são opacas e nunca pigmentadas. (Winn et al., 2008; Tortora, 2012; Cavalcanti, 2017)

Acinetobacter spp. como patógeno oportunista está envolvido em diversos episódios de infecções hospitalares em pacientes gravemente enfermos e imunossuprimidos, causando bacteremia, infecções do trato urinário e principalmente relacionado às infecções respiratórias. *Acinetobacter* spp. causadoras de IRAS são de difícil tratamento, devido a sua capacidade em adquirir resistência aos principais antimicrobianos que usualmente são prescritos na prática clínica. (Howard et al., 2012; Rocha, 2017)

Entre as diferentes espécies compreendidas no gênero *Acinetobacter*, destaca-se *A. baumannii* a qual tem acumulado resistência a uma ampla gama de antibióticos, tais como penicilinas, cefalosporinas e quinolonas. Assim, a classe antimicrobiana dos carbapenêmicos tornou-se terapia de escolha para os quadros infecciosos mais graves relacionadas à *Acinetobacter* spp. Entretanto, o surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos no ambiente hospitalar tem sido crescente, e na maioria das vezes associado à produção de enzimas β -lactamases (carbapenemases e oxacilinasas). (Harding et al., 2013; Rocha, 2017)

2.2. *Acinetobacter baumannii*

Existem mais de 30 espécies diferentes pertencentes ao gênero *Acinetobacter* que foram identificadas (Montero, J. G.; Villar, R. A. 2010). Por exemplo, *Acinetobacter* genoespécie 1 (*A. calcoaceticus*), genoespécie 2 (*A. baumannii*), genoespécie 3 e genoespécies 13TU, são fenotipicamente semelhantes, formando, assim, o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (AcB). Por apresentarem características fenotípicas semelhantes, não devem ser diferenciadas apenas por testes fenotípicos. Fazendo se necessária realização testes moleculares para a identificação da espécie. Entretanto, quando a *Acinetobacter* spp. não é identificada por métodos genéticos, são referidas como pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Bergogne-Berezin; Towner, 1996).

O avanço da biologia molecular e dos métodos genéticos que auxiliam na identificação do complexo AcB estão mais acessíveis, e a pesquisa do gene *bla*_{OXA-51-like} pode ser utilizada, uma vez que este gene codificante está presente intrinsecamente na espécie *A. baumannii* e pode ser utilizado para identificação da espécie deste microrganismo. (Evans; Amyes, 2014; Rocha, 2017)

Desta forma, *A. baumannii* caracteriza-se como genoespécie 2 do complexo AcB, sendo a espécie principal associada a doenças humanas. É, ainda, a espécie que mais apresenta resistência aos antibióticos e com maior importância clínica. *A. baumannii* é caracterizada por ser muito resistente a fatores ambientais, uma propriedade que facilita a sua disseminação rápida e o desenvolvimento de resistências frente aos antimicrobianos convencionais (Chuang, Y.C. et al. 2011).

Koulenti D., Tsigou E., Rello J. 2016, em estudo observacional prospectivo de 27 UTIs em nove países europeus diferentes identificou *A. baumannii* entre os patógenos mais comuns que causaram pneumonia nosocomial, sendo o isolado mais comum na Grécia e na Turquia.

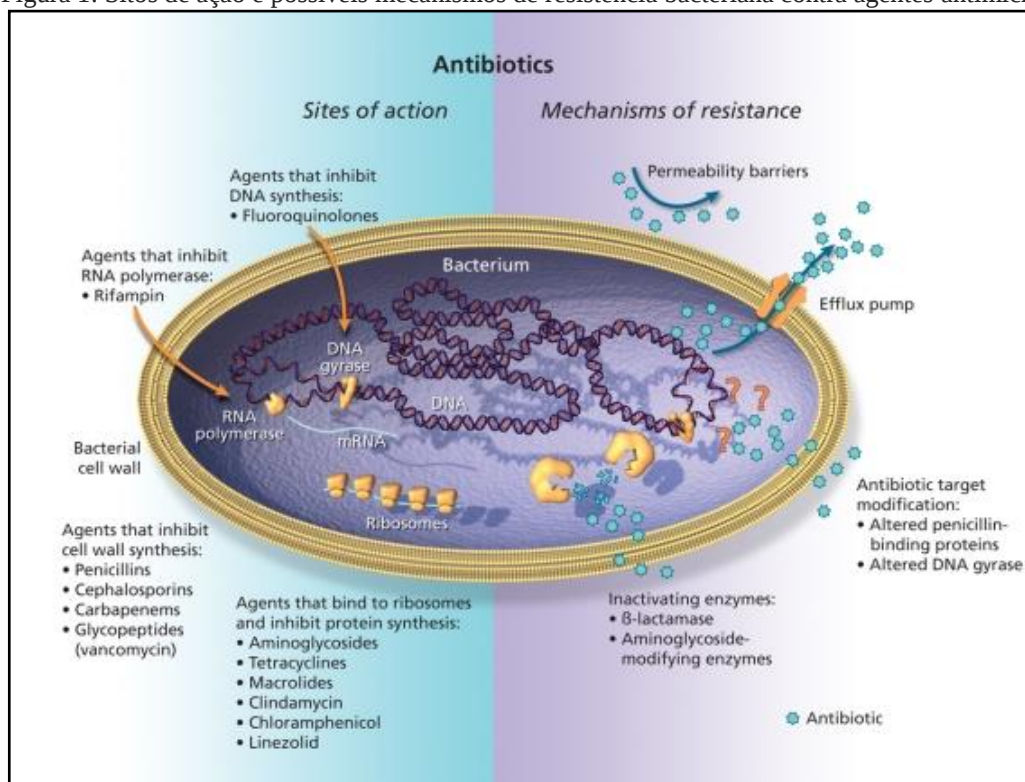
Diante da importância desta espécie no cenário de infecções hospitalares, o conhecimento da epidemiologia hospitalar das amostras isoladas de *A. baumannii* é fundamental para definição de medidas de prevenção e controle das infecções hospitalares.

2.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência aos antimicrobianos nada mais é que a capacidade de uma bactéria de se defender contra a ação dos antibióticos. Os seus mecanismos podem ser intrínsecos ou adquiridos e foram divididos de acordo com a forma de inativação do antibiótico. Os

mecanismos de resistência frequentemente expressos em cepas nosocomiais de *Acinetobacter* spp. incluem alteração da permeabilidade da membrana, alterações genéticas, bomba de efluxo e ações enzimáticas que degradam ou modificam antibióticos. (Figura 1) (Mulvey; Simor, 2009)

Figura 1: Sítos de ação e possíveis mecanismos de resistência bacteriana contra agentes antimicrobianos.



Fonte: Mulvey; Simor (2009).

2.3.1. Mecanismos enzimáticos

O mecanismo de resistência bacteriano mais frequente é a degradação do antimicrobiano através de enzimas. A partir da transferência de grupos químicos (acil, fosfatos, nucleotidil), existem enzimas que alteram a molécula da droga, podendo ser codificadas em cromossomos ou em elementos genéticos móveis.

A resistência aos β -lactâmicos relacionados à presença das enzimas β -lactamases são grandes exemplos deste mecanismo. As bactérias podem apresentar resistência à penicilina por produção de β -lactamases induzida pela presença do antibiótico e/ou codificada por meio de plasmídeos. Na intenção de neutralizar a ação destas enzimas, foram produzidos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico e tazobactam, para vencerem a degradação das enzimas, e assim, obter efeito no interior das células bacterianas. (Blair, 2014)

As β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) também são mediadas por plasmídeos, e inativam antibióticos mais potentes, como cefalosporinas de terceira geração. Cepas de *Klebsiella pneumoniae* podem produzir estes compostos enzimáticos, levando a maiores dificuldades nas escolhas terapêuticas. (Pfeifer, Y. et al.2010)

Enquanto o mecanismo de resistência clínica mais preocupante relacionado à *Acinetobacter* spp. tem sido a aquisição de enzimas β -lactamases, incluindo serina e metalo- β -lactamases, que conferem resistência aos carbapenêmicos. (Bonomo1, R., Szabo, A., 2006)

2.3.2. Permeabilidade da membrana

A redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo de resistência exclusivo de bactérias gram negativas, uma vez que estas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular, o que não existe na parede celular de bactérias gram positivas.

Os antibióticos devem ultrapassar a membrana externa ou toda a parede celular para poder atingir seu alvo e ter o efeito esperado. Antibióticos hidrofílicos, como β -lactâmicos e fluoroquinolonas, ultrapassam a membrana externa por difusão passiva através de proteínas de membrana externa, denominadas porinas. Alterações ou perda destas proteínas podem causar permeabilidade mais seletiva ou até mesmo impermeabilidade às drogas. Este mecanismo costuma afetar pouco à sensibilidade aos carbapenêmicos. (Rice, 2012)

2.3.3. Bomba de efluxo

Trata-se de um mecanismo de proteção bacteriana contra o ingresso de antimicrobianos ao interior da célula por meio de transporte ativo para o exterior celular através de um sistema denominado bomba de efluxo. Admitindo a célula bacteriana resistência antibióticos. Esse sistema de excreção é baseado na abertura de um canal que atravessa a membrana interna e externa da bactéria, permitindo a expulsão de moléculas e garantindo impermeabilidade à desinfetantes e a maioria dos antimicrobianos. (Neves, 2010)

2.4. β -LACTAMASES

β -lactamases são enzimas que hidrolizam o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico e impedindo que ele apresente alguma atividade contra as enzimas que são responsáveis pela

síntese da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos são a classe de antibióticos mais potentes e que representam a classe de antimicrobianos mais prescritos clinicamente, sendo compostas por cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e os carbapenêmicos. (Murray et al., 2004; Bertoncheli, R. Hörner, 2008).

Diversas β -lactamases foram identificadas, sendo necessárias variadas formas de classificação para agrupar estas enzimas, a partir de suas características bioquímicas e de suas estruturas moleculares. As β -lactamases formam grupos de acordo com suas estruturas primárias e divididas em quatro classes, de “A” a “D”, de acordo com Ambler (1980). E, também classificadas de acordo com seus distintos mecanismos de catalização. Desta forma estas classes foram identificadas em dois grupos: serina- β -lactamases (A, C e D) e as metalo- β -lactamases (classe B). (Bertoncheli, R. Hörner, 2008).

As β -lactamases, incluindo as carbapenemases, são categorizadas empregando diferentes critérios. A classificação proposta por Ambler (1980) se baseia na estrutura molecular das enzimas e inclui as quatro classes de β -lactamases: A, B, C e D. As classes A, C e D são compostas por enzimas com serina no sítio ativo, e a classe B é composta por enzimas com zinco em seu sítio ativo e, portanto, são chamadas de metalo- β -lactamases.

Já Bush, Jacoby e Medeiros, em 1995 correlacionaram os substratos e perfis de inibição das enzimas em grupos de 1 a 4, realizando divisão em subgrupos, e atualização dessas correlações em 2010. Assim, as carbapenemases fazem parte das classes A, B e D de Ambler (1980) e aos grupos 2df, 2f, 3a e 3b de Bush e Jacoby, 2010.

2.5. CARBAPENEMASES

As enzimas carbapenemases são β -lactamases hidrolisadoras de carbapenemínicos que conferem resistência a um amplo espectro de substratos β -lactâmicos. Baseando-se na classificação de Ambler, as β -lactamases de classe A com atividade carbapenemase podem ser codificadas em cromossomos ou elementos móveis genéticos, os plasmídeos. Já as β -lactamases de classe B são conhecidas como metalo- β -lactamases (M β L), são caracterizadas por hidrolizar todos os β -lactâmicos disponíveis comercialmente, salvo a exceção do aztreonam. O qual necessita de íons de zinco ou outros cátions divalente como cofator para obter ação catalítica. Não sendo inibidas pelas β -lactamases comercialmente acessíveis, porém podem ser inibidas por agentes quelantes de íons, como o EDTA. (Bertoncheli, R. Hörner, 2008).

O EDTA apresenta inibição das β -lactamases fenotipicamente, mas não são inibidores de β -lactamases, como tazobactam, clavulanato, sulbactam e avibactam. Onde as duas principais metalo- β -lactamases foram relatadas em *A. baumannii*, do tipo IMP e VIM. (Yum, J. H. 2002).

Yum, J. H. (2002), em estudo coreano, detectou VIM-2 β -lactamase em isolados de *A. baumannii* com níveis significativos de resistência aos carbapenêmicos. As β -lactamases de classe D também são referidas como enzimas do tipo OXA devido à sua capacidade preferencial de hidrolisar a oxacilina. A ocorrência recente mais problemática é o surgimento de numerosas enzimas do tipo OXA em *A. baumannii* que podem conferir resistência aos β -lactâmicos.

Entre o grupo OXA heterogêneo (que inclui mais de 100 enzimas), seis subgrupos foram identificados com vários graus de atividade hidrolisadora de carbapenemases: OXA-23, OXA-24/OXA-40, OXA-48, OXA-58, OXA-143, e OXA-51. Os primeiros cinco grupos são transportados em plasmídeos transmissíveis, enquanto o último grupo, OXA-51, é codificado cromossomicamente. Onde em sua maioria dos isolados de *A. baumannii* possui uma carbapenemase do tipo OXA-23, OXA-24/40 ou OXA-58, que são resistentes aos carbapenêmicos. Conforme explanado por Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. (2006). Esta resistência pode resultar de uma ação combinada de uma carbapenemase do tipo OXA e um mecanismo de resistência secundário, como deficiências das porinas ou bombas de efluxo super expressas.

Turton, J. F. et al. 2006 estudaram o papel de um elemento de inserção do promotor ISAb-1 na expressão de genes OXA carbapenemase em isolados de *A. baumannii* no reino unido. Os resultados encontrados sugeriam que ISAb-1 fornecia o promotor para *bla*_{OXA-51-like} e, provavelmente, para *bla*_{OXA-23-like}, contribuindo para a resistência aos carbapenêmicos.

2.6. ENZIMA KPC

A enzima carbapenemase KPC foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos de um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*. (Yigit et al., 2001) São carbapenemases pertencentes ao grupo A da classificação de Ambler, as enzimas *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), sendo a mais importante clinicamente das carbapenemases do grupo. Diversas variantes de enzimas KPC já foram identificadas. Essas enzimas residem em plasmídeos transmissíveis e conferem resistência à maioria dos β -lactâmicos. As bactérias

produtoras de enzima KPC hidrolisam os β -lactâmicos em taxas variadas, contribuindo para diferentes perfis de susceptibilidade antimicrobiana testadas *in vitro*. A enzima KPC está bastante envolvida em surtos endêmicos no Brasil e no mundo. (Yigit et al., 2001; Jácome, 2011)

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., realizar a detecção genética de enzimas oxacilinases e de β -lactamases proveniente de sítios infecciosos de pacientes de um hospital terciário, coletados durante os anos de 2018 e 2019.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. frente aos antimicrobianos;
- Investigar a ocorrência dos genes codificantes de enzimas oxacilinases *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} nos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. proveniente de sítios de infecção de pacientes de um hospital terciário;
- Investigar a ocorrência de genes codificantes de β -lactamases *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, e *bla*_{KPC};
- Analisar o perfil clonal dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho consiste em uma pesquisa que foi desenvolvida através de estudo descritivo de base laboratorial, que avaliou o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos, o perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp., e a detecção molecular da frequência dos genes codificadores relacionados à resistência aos carbapenêmicos do tipo OXA, MβL e KPC em um hospital terciário de Recife, Pernambuco. Os isolados bacterianos foram adquiridos de pacientes internados em um hospital público em Recife-PE, durante o período de 2018 a 2019. E que foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS/UFPE) número CAAE 0490.0.172.000-11.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

Os procedimentos microbiológicos e moleculares foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Federal de Pernambuco (DMT/UFPE), onde os isolados bacterianos obtidos por demanda espontânea foram submetidos aos testes moleculares para pesquisa das enzimas oxacilinases, β-lactmases e relação clonal.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram provenientes de pacientes internados em diversos setores de um hospital público terciário na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, de diferentes sítios de infecção. As cepas foram disponibilizadas para estudo pelo Laboratório de Microbiologia do serviço, durante o período de 2018 e 2019.

4.4 TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra deste estudo foi de 35 isolados bacterianos, obtidos por demanda espontânea e provenientes de sítios de infecção por *Acinetobacter* spp., e se deu por conveniência, fornecidos pelo laboratório de microbiologia do hospital.

4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os isolados foram identificados e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi analisado através sistema automatizado BD PhoenixTM no Laboratório de Microbiologia do próprio hospital. Em seguida, foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, onde foram conservados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) adicionado de glicerol 20% e mantidos em estoque a -80°C.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram testados para os seguintes antibióticos: amicacina, ampicilina-sulbactam, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, levofloxacino, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam e trimetoprim-sulfametoxazol, seguindo os critérios de interpretação do BrCast.

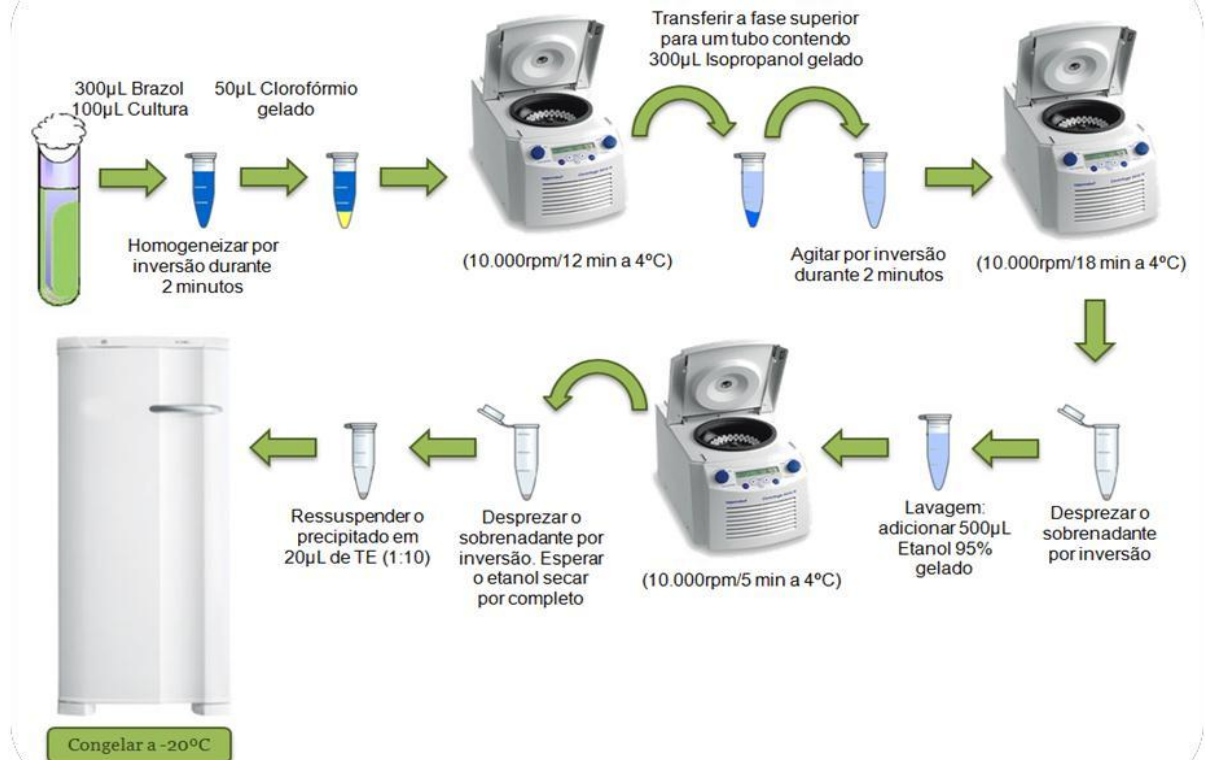
4.6 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp.

4.6.1 Extração do DNA total

Os isolados foram reativados em tubos de ensaio contendo meio caldo BHI, incubados por 48 horas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, semeados em meio Luria Bertani (LB) e incubados em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por mais 24 horas.

A extração do conteúdo genético foi executada através do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo do fabricante. (figura 2) Enquanto a quantificação do DNA extraído foi realizada através de espectrofotometria entre o comprimento de onda de 260 a 298 nm. (Jácome, 2011)

Figura 2: Representação do esquema da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia).



Fonte: Jácome, (2009).

4.6.2. Detecção dos genes de oxacilinas

As Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) foram realizadas para a detecção dos genes de oxacilinas: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} nos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., obtidos de diferentes sítios de infecção, de acordo com a metodologia descrita pelos artigos referenciados para cada gene, conforme a tabela 1. Os primers usados nas reações de PCR e o tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) também expostos na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos primers para pesquisa dos genes de oxacilinases.

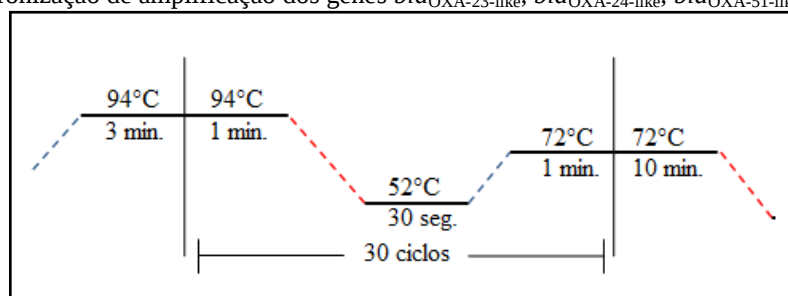
Genes	Primers (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	F:GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R:AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	F:TAATGCTTTGATCGGCCTTG R:TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	F:AAGTATTGGGGCTTGTGCTG R:CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	Woodford et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	F:TGGCACTTTCAGCAGTTCCT R:TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149	Higgins et al., 2010

F: Forward, R: Reverse, pb: Pares de base.

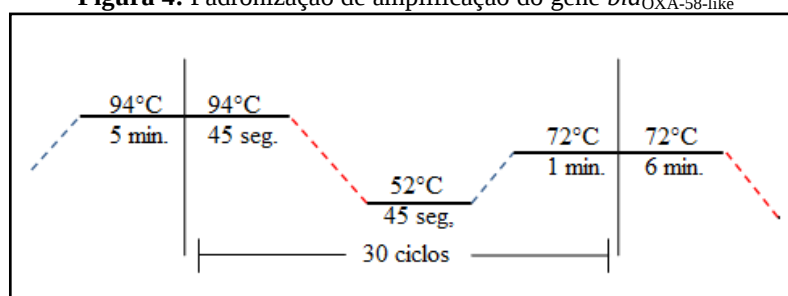
Fonte: O autor, (2022)

Para a detecção dos genes OXA carbapenemases, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo. Para os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, e *bla*_{OXA-143-like} cada reação de amplificação incluiu: 10 ng de DNA genômico (5,0 µL), 10 pmol de cada *primer* (2 µL para cada *primer*), 5x tampão (5,0 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Para o gene *bla*_{OXA-58-like}: a reação de amplificação contém: 10 ng de DNA genômico (10,0 µL), 20 pmol de cada *primer* (2,5 µL para cada *primer*), 5x tampão (5,0 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura.

Os padrões de amplificação dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, e *bla*_{OXA-143-like}: desnaturação inicial 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, a extensão final 72°C por 10 minutos. (Figura 3) Para as reações de amplificação do gene *bla*_{OXA-58-like}: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, em seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão 72°C por 1 minuto, a extensão final 72°C por 6 minutos. (Figura 4) (Woodford et al., 2006; Higgins, 2010)

Figura 3: Padronização de amplificação dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, e *bla*_{OXA-143-like}

Fonte: O autor, (2022)

Figura 4: Padronização de amplificação do gene *bla*_{OXA-58-like}

Fonte: O autor, (2022)

4.6.3. Detecção dos genes relacionados à produção de metalo-β-lactamases (MβL)

As reações de amplificação para os genes codificantes de metalo-β-lactamases foram realizadas nos isolados de *Acinetobacter* spp. para detecção dos genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1}. Foram utilizados os primers descritos por Poirel et al. (2011) e Jácome et al. (2016), conforme tabela 2. Para a detecção dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo. Para os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1}, cada reação de amplificação incluiu: 25 ng de DNA genômico (1 µL), 10 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 1x tampão (1 µL), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 1,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura Jácome et al. (2016).

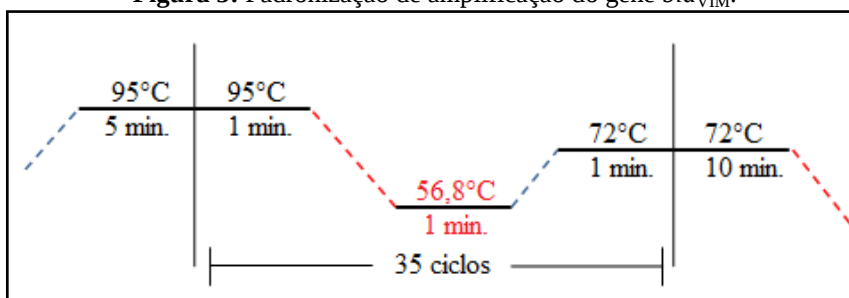
Para cada corrida de amplificação foi incluído um controle negativo, composto por microtubo contendo todos os componentes da reação e adicionando água ultrapura ao invés do DNA genômico, e um controle positivo para cada gene: *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48–1997A) e *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319). Disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE.

Tabela 2. Primers e temperatura de anelamento para pesquisa dos genes de MBL

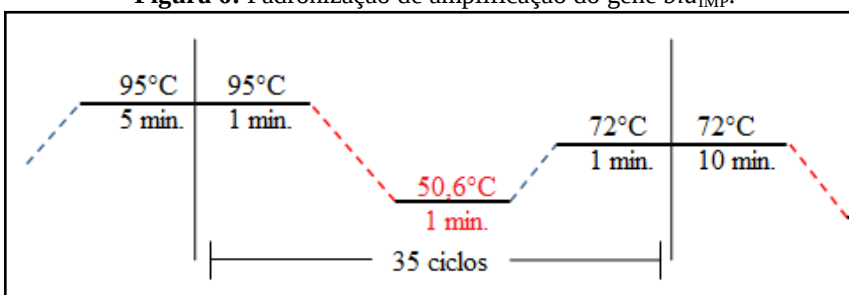
Genes	Primers (5' – 3')	Temperatura de Anelamento	Referência
<i>bla_{VIM}</i>	F: CAGATTGCCGATGGTGTTTGG R: AGGTGGGCCATTTCAGCCAGA	56,8°C	Jácome et al., 2016
<i>bla_{IMP}</i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC R: GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT	50,6°C	Jácome et al., 2016
<i>bla_{SPM-1}</i>	F: CCTACAATCTAACGGCGACC R: TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	60,0°C	Jácome et al., 2016

F: Forward, R: Reverse. (Autor, 2022)

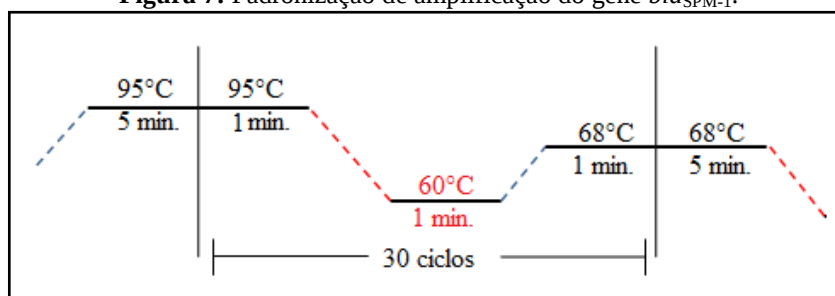
As amplificações dos genes *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* foram realizadas nas seguintes condições de PCR: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento segundo a tabela 2, por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, a extensão final por 10 minutos a 72°C. Jácome et al. (2016). Condições dispostas nas figuras 5 e 6 respectivamente. Para as amplificação do gene *bla_{SPM-1}*: desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo descrito na tabela 02 por 1 minuto e extensão a 68°C por 1 minuto, a extensão final 68°C por 5 minutos. Conforme condições de amplificação do gene *bla_{SPM-1}* de Jácome et al. (2016) modificado, como ilustrado na figura 7.

Figura 5: Padronização de amplificação do gene *bla_{VIM}*.

Fonte: O autor, (2022)

Figura 6: Padronização de amplificação do gene *bla_{IMP}*.

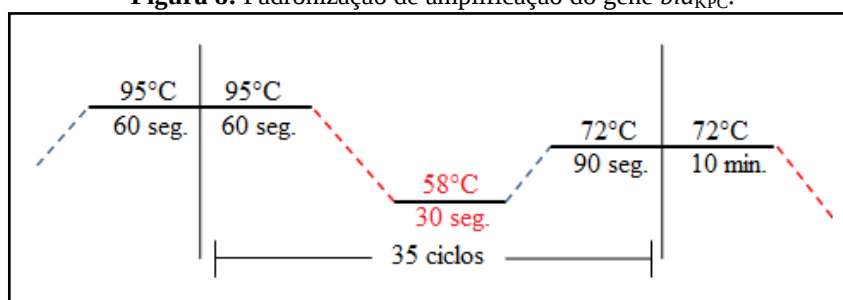
Fonte: O autor, (2022)

Figura 7: Padronização de amplificação do gene *bla_{SPM-1}*.

Fonte: O autor, (2022)

4.6.4. Detecção de genes *bla_{KPC}*

Para o gene *bla_{KPC}* cada reação de amplificação incluiu: 5 ng de DNA genômico (0,5 µL), 25 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 5x tampão (5 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Os padrões de amplificação do gene *bla_{KPC}* estão dispostos de acordo com a figura 8.

Figura 8: Padronização de amplificação do gene *bla_{KPC}*.

Fonte: O autor, (2022)

4.6.5. ERIC-PCR

A pesquisa da relação genética entre os isolados ocorreu através da técnica de ERIC-PCR. Onde as reações foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']); (ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. (Duan et al., 2009).

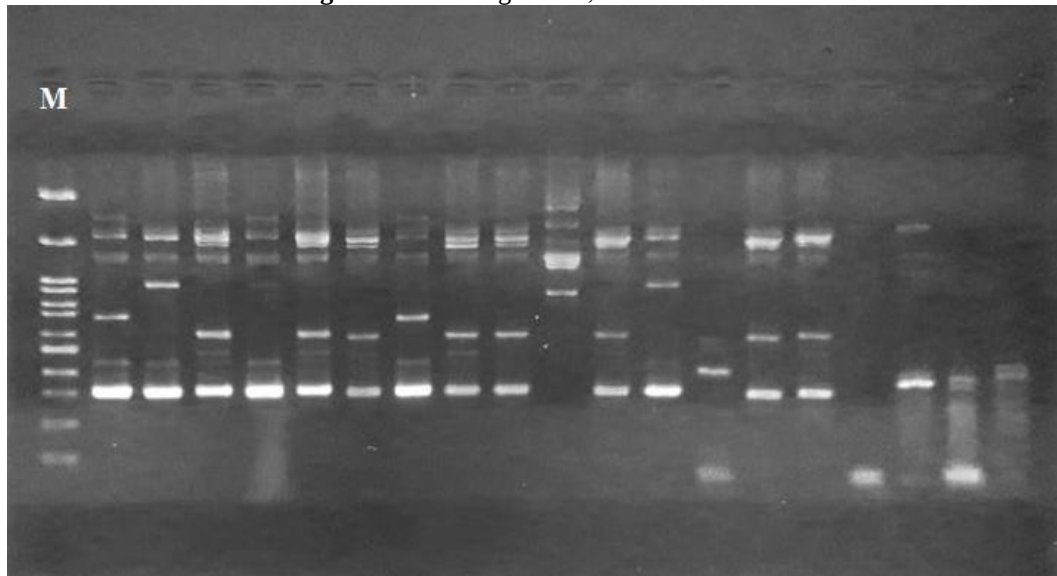
Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, extensão final por 16

minutos à 72°C. Todos os produtos de PCR corados com *Blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV.

4.6.6. Detecção das bandas de DNA

Os produtos de PCR foram corados com *Blue-green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia): Corante fluorescente de alta sensibilidade para detectar os ácidos nucléicos submetidos à eletroforese a 1,0% - 1,5% em géis de agarose em TBE buffer (Tris-borato 0,089M e EDTA 0,002M) sob voltagem constante de 100V, visualizados sob luz UV e em seguida fotodocumentados. (Figura 9)

Figura 9: Gel de agarose 1,5% sob luz U.V.



Fonte: O autor, (2022)

5 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico, que será submetido à Research, Society and Development.

DETECÇÃO MOLECULAR DE OXACILINASES E CARBAPENEMASES EM ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp. PROCEDENTES DE UM HOSPITAL DE RECIFE-PE.

JOSÉ LUCIANO BRAINER DE FARIAS FILHO, ADRIANA MARIA COSTA MARQUES DA SILVA, SERGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR, JAILTON LOBO DA COSTA LIMA, CARLOS ROBERTO WEBER SOBRINHO, MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL

RESUMO

O surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos de *Acinetobacter baumannii* (CRAb) dentro do ambiente hospitalar, por vezes está associada a enzimas β -lactamases (oxacilinases e carbapenemases). O objetivo do presente estudo é avaliar a ocorrência de genes de oxacilinases (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}) e carbapenemases do tipo KPC, metalo- β -lactamases, (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}), além de analisar o perfil clonal dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados durante os anos de 2018 e 2019. Foram analisados 35 isolados de *Acinetobacter* spp. Destes, 33 isolados bacterianos foram multidroga resistentes inclusive aos carbapenêmicos. Em relação à detecção genética das enzimas oxacilinases, as frequências das oxacilinases foram: OXA-51 (85,71%), OXA-143 (77,4%) e OXA-23 (14,28%), destacando que OXA-143 foi a segunda mais frequente, sendo este padrão diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo. O gene *bla*_{VIM} (8,57%) apresentou frequência baixa nos isolados *Acinetobacter* spp. estudados e o gene *bla*_{KPC} foi detectado em 5,71%. De acordo com os resultados, a ERIC-PCR mostrou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. avaliados, com similaridade variando de 24% a 100%, sendo identificado dois clones. A OXA-143 foi a segunda oxacilinase mais frequente nos isolados estudados, diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. beta-lactamases. resistência microbiana a medicamentos

ABSTRACT

The emergence of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* (CRAb) within the hospital environment is sometimes associated with β -lactamases enzymes (oxacylinases and carbapenemases). For this reason, the aim of this study was to evaluate the occurrence of oxacylinase genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like}) and carbapenemases in the KPC type, metallo- β -lactamases, (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}), in addition to analyzing the clonal profile of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from patients from a tertiary hospital in Recife-PE, collected during the years 2018 and 2019. 35 *Acinetobacter* spp. isolates were analyzed, of these 33 bacterial isolates were multidrug resistant, including carbapenems. Regarding the genetic detection of oxacylinase enzymes, the frequencies of oxacylinases OXA-51 (85,71%), OXA-143 (77,4%) and OXA-23 (14,28%) found in the study, highlighting that OXA-143 was the second most frequent, which is different from previous data in other studies in Brazil and on the world. The *bla*_{VIM} gene (8,57%) showed a low frequency in the *Acinetobacter* spp. isolates studied and the *bla*_{KPC} gene was detected in 5,71%. According to the results, ERIC-PCR showed genetic diversity and heterogeneity among the 35 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. evaluated, with similarity ranging from 24% to 100%, and two clones were identified. OXA-143 was the second most frequent oxacillinase in the isolates studied, different from previous data in other studies in Brazil and worldwide.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. beta-lactamases. microbial drug resistance.

RESUMEN

La aparición de cepas de *Acinetobacter baumannii* (CRAb) resistentes a los carbapenémicos en el ámbito hospitalario se asocia en ocasiones a enzimas β -lactamases (oxacilinasas y carbapenemas). Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la aparición de genes de oxacilinasas (tipo *bla*_{OXA-23}, tipo *bla*_{OXA-24}, tipo *bla*_{OXA-51}, tipo *bla*_{OXA-58} y tipo *bla*_{OXA-143}) y carbapenemas. en el tipo KPC, metalo- β -lactamasas, (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}), además de

analizar el perfil clonal de aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. de pacientes de un hospital de tercer nivel en Recife-PE, recolectados durante los años 2018 y 2019. Se analizaron 35 aislamientos de *Acinetobacter* spp., de estos 33 aislamientos bacterianos fueron multirresistentes, incluyendo carbapenémicos. En cuanto a la detección genética de enzimas oxacilinasas, las frecuencias de OXA-51 (85,71%), OXA-143 (77,4%) y OXA-23 (14,28%) encontradas en el estudio, destacando que OXA-143 fue la segunda más frecuente, lo que difiere de datos previos en otros estudios en Brasil y en el mundo. El gen *bla*_{VIM} (8,57%) mostró una frecuencia baja en los aislados de *Acinetobacter* spp estudiados y el gen *bla*_{KPC} se detectó en el 5,71%. Según los resultados, ERIC-PCR mostró diversidad y heterogeneidad genética entre los 35 aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. evaluados, con una similitud que va del 24% al 100%, y se identificaron dos clones. OXA-143 fue la segunda oxacilinasas más frecuente en estudios aislados, a diferencia de datos previos en otros estudios en Brasil y en el mundo.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*. beta-lactamasas. farmacorresistencia microbiana.

INTRODUÇÃO

Nos diversos setores dos hospitais, destacando unidade de terapia intensiva (UTI) encontram-se pacientes críticos com variadas patologias e comorbidades em uso de diversos dispositivos invasivos, como cateteres e tubos (Hernández – Gómez et al., 2014). Estes pacientes ficam mais susceptíveis a adquirir infecções diversas (Curcio, 2011). Nas últimas décadas houve aumento mundial no número de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos, principalmente os gram negativos como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. (Soltani et al., 2014).

Para terapêutica antimicrobiana, estão disponíveis diversas classes de fármacos utilizados no tratamento do paciente com quadro infeccioso. Os carbapenêmicos configuram a principal escolha no tratamento de bacilos gram negativos multirresistentes, no entanto, o surgimento de cepas resistentes a esta classe de antibióticos configurou um cenário de problema de saúde pública e um desafio na terapêutica dos pacientes (Wirth et al., 2009).

O principal mecanismo da resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. está relacionado às OXA-carbapenemases e, em menor frequência, as carbapenemases da Classe B de Ambler, as metalo-β-lactamases (MβL). As enzimas OXA mais presentes em *A. baumannii* são divididas em seis subfamílias as intrínsecas *bla*_{OXA-51-like} e as adquiridas

*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} e *bla*_{OXA-235-like}, sendo *bla*_{OXA-23-like} mais relatado em *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAb) em todo mundo. (Opazo et al., 2012; Bush & Bradford, 2020).

A β -lactamase do tipo KPC é classificada na classe molecular “A” de Ambler, (carbapenemases serina-dependentes), sendo encontrada em muitas espécies de bactérias gram negativas, incluindo as pertencentes à ordem das *Enterobacteriales* e espécies não fermentadoras (incluindo *P. aeruginosa* e *A. baumannii*), no entanto, são mais predominantes em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Chen et al., 2015).

As enzimas M β L são inibidas *in vitro* pelo EDTA, quelante de metais, e são capazes de inibir o ácido clavulânico. Essas enzimas hidrolisam o imipenem, penicilinas, cefalosporinas de espectro amplo e restrito, porém, não são capazes de hidrolisar o aztreonam. As primeiras M β L foram descritas no *Bacillus cereus*. Algumas M β L foram descritas em *A. baumannii*, a Verona imipenemase (VIM), German imipenemase (GIM), Seul imipenemase (SIM) e São Paulo metalo- β -lactamase (SPM), Korean imipenemase (KHM), Austrelian imipenemase (AIM), New Delhi metalo-beta-lactamase (NDM). (Labarca et al, 2014, Jacomé et al, 2016)

Isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos presentes em unidades de saúde estão frequentemente associados, na maioria das vezes, à aquisição de carbapenemases do tipo OXA, incluindo os genes *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-23-like}. A disseminação inter e intra hospitalar de isolados abrigando esses genes de resistência tem aparecido em relatos no mundo todo (Aliramezani et al., 2016), como também descrita a ocorrência de M β L (Labarca et al, 2014, Jacomé et al, 2016).

β -lactamases, em especial as carbapenemases, estão descritas globalmente, com variantes genéticas específicas em relação às preferências geográficas (Bush & Bradford 2020). Este estudo tem por objetivo avaliar a ocorrência dos genes codificantes relacionados à resistência aos carbapenêmicos do tipo OXA, M β L e KPC, além de analisar o perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp., provenientes de hospital terciário de Recife-PE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foi desenvolvido estudo descritivo de base laboratorial, que avaliou o perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp., e a detecção da frequência dos genes codificantes relacionados à resistência aos carbapenêmicos do tipo OXA, M β L e KPC de um hospital terciário de Recife-Pernambuco. Os isolados bacterianos foram de pacientes internados no hospital público de Recife-PE, durante o período de 2018 a

2019, cujo estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS/UFPE) número CAAE 0490.0.172.000-11.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram provenientes de pacientes internados em diversos setores de um hospital terciário público na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, e coletados em diferentes sítios de infecção. Os isolados foram identificados e o perfil de susceptibilidade foi analisado no sistema automatizado BD PhoenixTM no Laboratório de Microbiologia do próprio hospital. Estes isolados foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, onde foram conservados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) adicionado de glicerol 20% e mantidos em estoque a -80°C.

Para a realização dos ensaios microbiológicos e moleculares os isolados foram reativados em tubos de ensaio contendo caldo BHI, incubados por 48 horas em estufa a 36 ± 1 °C, semeados em meio Luria Bertani (LB) e incubados em estufa a 36 ± 1 °C por 24 horas e posteriormente, submetidos à identificação molecular através da detecção do gene *bla*_{OXA-58-like} para confirmação da espécie *A. baumannii*, de acordo com Woodford et al., 2006.

A extração do conteúdo genético foi executada através do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo do fabricante. Enquanto a quantificação do DNA extraído foi realizada através de espectrofotometria entre o comprimento de onda de 260nm a 298nm. Jácome, (2011). Para detectar dos genes tipo OXA foram realizadas reações em cadeia de polimerase (PCRs), utilizados os primers específicos. (Woodford et al., 2006; Higgings,2010).

As PCRs para detecção dos genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC} foram realizadas utilizados os primers descritos por Poirel et al. (2011) e Jacomé et al. (2016). Para a detecção de cada um dos referidos genes codificantes, a reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL paracada tubo. Para o gene *bla*_{KPC}, a reação de amplificação incluiu: 5 ng de DNA genômico (0,5 µL), 25 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 5x tampão (5 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Para os genes codificantes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1} cada reação de amplificação incluiu: 25 ng de DNA genômico (1 µL), 10 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 1x tampão (1 µL), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 1,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura (Jácome et al., 2016).

Para a detecção dos genes OXA carbapenemases, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, e *bla*_{OXA-143-like}, cada reação de amplificação incluiu: 10 ng de DNA genômico (5,0 µL), 10 pmol de cada *primer* (2 µL para cada *primer*), 5x tampão (5,0 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Para o gene *bla*_{OXA-58-like}, a reação de amplificação contém: 10 ng de DNA genômico (10,0 µL), 20 pmol de cada *primer* (2,5 µL para cada *primer*), 5x tampão (5,0 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U *Taq* DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Woodford et al., (2006); Higgings, (2010).

A pesquisa da relação genética entre os isolados ocorreu através da técnica de ERIC-PCR. Onde as reações foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos primers (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. (Duan et al., 2009). Todos os produtos de PCR corados com *Blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV.

RESULTADOS

Os 35 isolados bacterianos provenientes de vários sítios de infecção foram analisados neste estudo, sendo de amostras de hemocultura (10), secreção traqueal (17), ponta de cateter (4), secreção biliar (1), líquido pleural (1), tecido (1) e urina (1). (Figura 1)

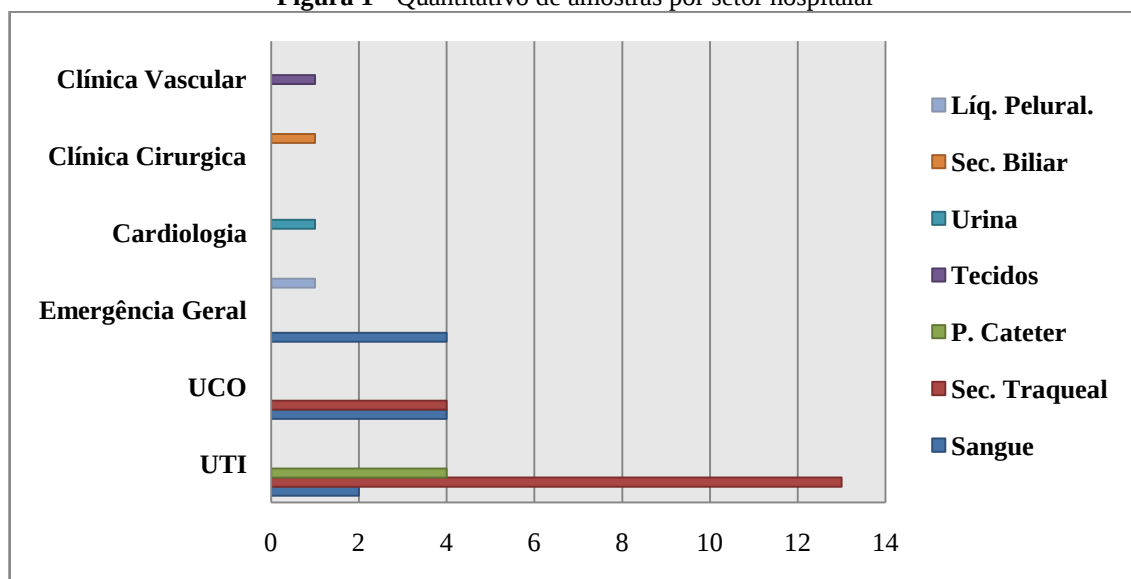
Em relação ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Acinetobacter* spp., 94,3% (33/35) foram considerados como multidroga resistente (MDR). Estes apresentaram resistência aos carbapenêmicos (imipinem e meropenem), às cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima e ceftriaxona), piperacilina/tazobactam, fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino). Apenas dois isolados foram resistentes a apenas uma das classes, ou seja, Não-MDR. (Tabela 1)

Tabela 1 - Frequência de isolados multidroga resistente de *Acinetobacter* spp. nos sítios de infecção

Perfil de resistência	Origem do Isolado			
	Secreção Traqueal	Sangue	Ponta de Cateter	Outros
(%) MDR	17 (100%)	9 (90%)	4 (100%)	3 (75%)
(%) Não-MDR	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	1 (25%)

Fonte: O autor, (2022)

Figura 1 - Quantitativo de amostras por setor hospitalar



Fonte: O autor, (2022)

Em relação à pesquisa dos genes codificantes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}, os genes mais frequentes entre os 35 isolados foram: *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-143-like}, com porcentagens de 85,71% e 77,14% respectivamente, enquanto os genes *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-23-like} foram menos frequentes. O gene *bla*_{OXA-24-like} não foi detectado em nenhum dos isolados deste estudo. (Tabela 2)

Tabela 2 - Detecção dos Genes OXA's

Gene	Nº Isolado	%
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	05	14,28
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	-	0
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	30	85,71
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	13	37,14
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	27	77,14

Fonte: O autor, (2022)

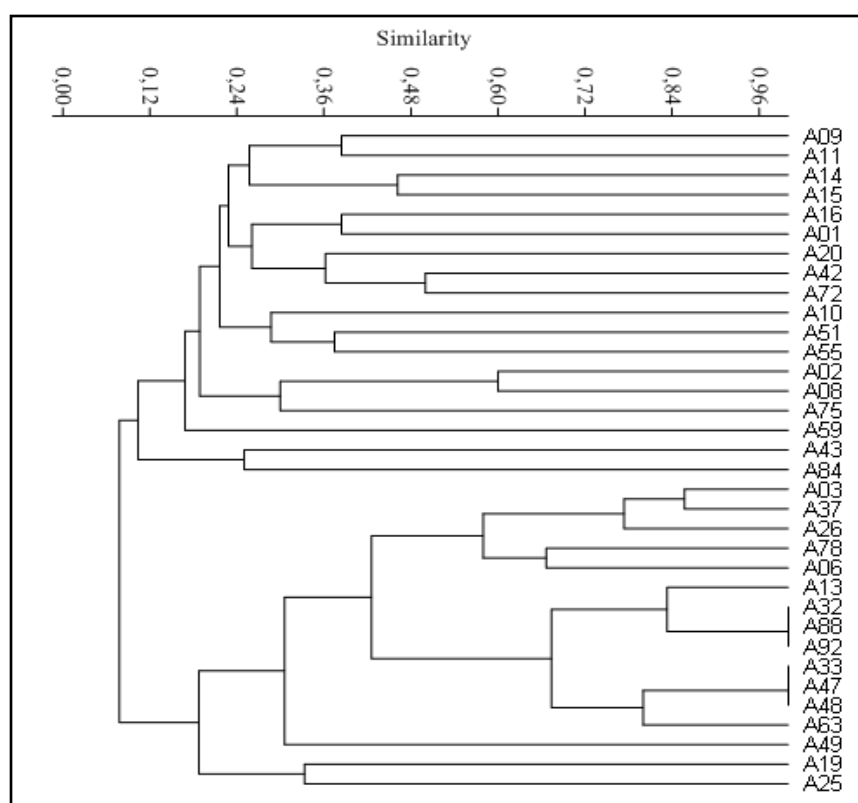
No que diz respeito aos genes β -lactamases *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, e *bla*_{KPC}, dos 35 isolados analisados, detectamos apenas dois isolados (5,71%) do gene *bla*_{KPC} e três (8,57%) do gene *bla*_{VIM}. *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP} não foram detectados em nenhum dos isolados. (Tabela 3)

Tabela 3 - Detecção dos Genes β -lactamases

Gene	Nº Isolado	%
KPC	02	5,71
VIM	03	8,57
SPM-1	-	0
IMP	-	0

Fonte: O autor, (2022)

A técnica de ERIC-PCR foi aplicada para análise da relação filogenética entre os isolados. Esse método de tipagem molecular foi selecionado por ser de fácil execução e com a obtenção de resultados confiáveis. De acordo com os resultados, a ERIC-PCR mostrou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. avaliados. Com similaridade variando entre 24% a 100%, sendo identificados apenas dois clones. Clone 1: respresentado pelos isolados A32, A88 e A92, e o clone 2 pelos isolados A33, A47 e A48. (Figura 2)

Figura 2 - Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. de um hospital terciário de Recife-PE, Brasil.

Fonte: O autor, (2022)

DISCUSSÃO

Em 2019, seis patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii*, e *Pseudomonas aeruginosa*) foram responsáveis por mais de 250.000 mortes relacionada à resistência antimicrobiana. Estima-se que *A. baumannii* seja a quarta causa de mortes mundiais relacionadas à resistência aos carbapenêmicos. (Lancet,2019). Estudos genômicos com diferentes isolados de *A. baumannii*, procedentes de vários hospitais em Recife, Pernambuco (Leal et al, 2020), descreve que *A. baumannii* tem uma plasticidade genômica, onde os marcadores de resistência espalham esta resistência em diversos ambientes, principalmente nos hospitalares.

As infecções nosocomiais relacionadas ao *Acinetobacter* spp. tem sido importante objeto de estudo, devido à grande variedade de mecanismos de resistência bacteriana, tornando a terapêutica antimicrobiana um desafio. Estudos como o de Tamar, 2021 apontam o impacto direto no aumento das cepas MDR, como *A baumannii* (Tamar et al., 2021).

No que diz respeito à procedência do sítio de infecção, no presente estudo foram identificados 35 isolados de *Acinetobacter* spp. de diferentes sítios. Destes, 48% estavam presentes em secreção traqueal, 28% em amostras sanguíneas, e 16% em ponta de cateter, sendo este último o sítio menos frequente. Oliveira et al., 2019 realizou análise de 114 isolados obtidos em dois hospitais gerais localizados em Niterói-RJ, onde foi descrita uma frequência de 83,3% de isolados de *Acinetobacter* spp. em amostras clínicas de secreção traqueal, 12,5% lavado bronqueoalveolar, 20,2%, sangue, 10,5% urina e 7,9% ponta de cateter. Já no estudo de Castilho et al., 2017, foram obtidos 84 isolados de *A. baumannii*, sendo o pulmão a topografia de infecção mais comum (53,1%), seguido pelo local da intervenção cirúrgica (10,9%), trato urinário (7,8%) e corrente sanguínea (6,2%). Tais resultados concordam que este microrganismo está mais frequentemente associado a infecções do trato respiratório.

Em relação ao gene *bla_{KPC}*, o mesmo foi detectado em apenas 2 (5,71%) dos 35 isolados de *Acinetobacter* spp., sendo considerado um baixo índice quando comparado aos estudos de Araujo Lima et al., 2020, que detectou uma frequência de 22,85/% (35) do gene KPC nos isolados de *A. baumannii* procedentes de dois hospitais públicos de Recife, Pernambuco. Assim como Ribeiro et al, 2016, em estudo com 128 isolados de *A. baumannii* na cidade de São Luis, Maranhão, detectou o gene *bla_{KPC}* em 16,4% dos isolados de *A. baumannii* analisados.

Jácome et al., 2016 em seu estudo com 36 isolados não detectou o gene *bla_{KPC}* nos isolados de *Acinetobacter* spp. Assim, embora a frequência de identificação do gene *bla_{KPC}* mostre-se maior em alguns estudos, são resultados discordantes mas que apresentam algumas variáveis, de acordo com o perfil dos pacientes internados, perfil microbiológico do setor hospitalar, epidemiologia do hospital, sendo necessário um maior aprofundamento destas análises.

A ocorrência dos genes, *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* não é muito frequente em isolados de *Acinetobacter* spp. (Bush & Bradford, 2020). O primeiro relato de *bla_{SPM-1}* em *Acinetobacter* spp. no Brasil foi descrito em paciente oncológico de Recife, Pernambuco (Jácome et al, 2016). Dados sobre a ocorrência de MβL no Brasil em *Acinetobacter* spp., descrevem uma frequência baixa destas enzimas. Um estudo na Região do Amazonas, em Belém-PA com 478 isolados de *Acinetobacter* spp., detectou o gene *bla_{IMP-1}* em 03. (Brasiliense et al, 2019). Estudo realizado em Recife, Pernambuco, por Araujo Lima et al, 2020, 35 isolados de *A. baumannii* foram analisados, sendo descrita uma frequência de 2,8% do gene *bla_{VIM}*, além de apenas 01 isolado albergando o gene *bla_{IMP}*.

Um estudo com quantitativo amostral mais expressivo foi realizado na Unidade Terapia Intensiva (UTI) em Kampala, Uganda (Aruhomukama et al, 2019). Dados de 488 isolados de *A. baumannii* descrevem uma frequência de 4,3% do gene *bla_{VIM}*. Assim, tanto análises de estudos brasileiros como a análise internacional mencionada, sugerem que os genes MβL em isolados de *Acinetobacter* spp. são pouco frequentes quando comparados com as OXA-carbapenemases.

Já no que diz respeito às OXA-carbapenemases, em isolados de *A. baumannii*, OXA-58, OXA-24/40, e OXA-143, OXA-51, OXA-23 permanecem como mais frequentes (Héritier C et al, 2005, Higgins PG et al, 2009). Os dados analisados no presente estudo demonstram que a OXA-51 foi a mais frequente, presente em 85,87% dos isolados. Em segundo lugar ficou a OXA-143, identificada em 77,14%. Estudos brasileiros como o de Castilho et al, 2017 que detectou 55,1% o gene *bla_{OXA-23-like}*, Oliveira et, 2019 (95,6%) e Gollino et, al, 2021 (94,4%) e internacionais o estudo de Aruhomukama et al, 2019 que indentificou 29% e o de Aliramezani, et al. 2016 22,2% para o gene *bla_{OXA-23-like}* como sendo mais frequente que a OXA-143 do presente estudo.

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada neste estudo para investigação da relação filogenética entre os isolados. Esta análise favorece melhor entendimento da epidemiologia dos surtos e identificação de coinfeções aprimorando o controle da infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) (Al-Hamad A et al 2020). Podemos destacar que outros autores

descrevem a relação filogenética de isolados de *Acinetobacter* spp. relacionado a IRAS, utilizando a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis* - *PFGE*) (Brasillience et al, Oliveira et al, 2019). No nosso estudo a técnica ERIC-PCR foi selecionada por ser rápida, de fácil execução e confiável na obtenção de dados para análise epidemiológica como descrito em outros artigos (Araujo Lima et al, 2020 e Martins et al, 2014) das linhagens bacteriana que circulam no ambiente hospitalar.

De acordo com os resultados obtidos pela ERIC-PCR, podemos descrever que ocorreu uma diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., sendo identificados apenas dois clones. Apresentando uma similaridade entre 24% a 100%. Estes dados concordam com outros trabalhos que encontraram clones dispersos no mesmo hospital, no estudo de Brasillience et al., 2019 e entre hospitais evidenciado por Araújo Lima et al., 2020.

CONCLUSÃO

A rápida disseminação global de bactérias que causam infecções, e que resistem aos tratamentos com antibióticos comumente utilizados na prática clínica, torna fundamental a vigilância em resistência antimicrobiana. Os dados filogenéticos fornecem informações que vão subsidiar mais opções de tratamentos e estratégias em políticas de redução de IRAS (Kurirara et al, 2020).

Com os resultados obtidos no presente estudo, podemos descrever que o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos está relacionado à resistência bacteriana aos carbapenêmicos nos 33 isolados bacterianos de *Acinetobacter* spp. de hospital terciário Recife-Pernambuco. Estes foram, também, considerados como MDR, sendo as amostras clínicas mais frequente de secreção traqueal e corrente sanguínea.

Em relação à detecção genética das enzimas oxacilinases OXA-51, OXA-143 e OXA-23 foram as mais frequentes no estudo, destacando que OXA-143 apresentou um padrão diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo. A ocorrência dos genes *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* ocorreu com frequência baixa nos isolados *Acinetobacter* spp. estudados.

A β -lactamases KPC, no presente estudo foram detectadas em frequência de 5,71%, considerada índice baixo quando comparada a outros estudos do Brasil. A análise filogenética mostrou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., sendo identificados apenas dois clones.

REFERÊNCIAS:

- Aliramezani, A. et al. Clonal relatedness and biofilm formation of OXA-23- producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. **Microbial Pathogenesis**, London, US, v.99, p. 204-208, 2016.
- Al-Hamad A. et al. Molecular characterization of clinical and environmental carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a hospital of the Eastern Region of Saudi Arabia. **J Infect Public Health**. 13(4), p.632-6. 2020.
- ANVISA -. Patient Safety and Quality of Health Services Newsletter. **National Health Surveillance Agency**. 2019.
- Araujo Lima, A. V. et al. Occurrence and diversity of intra-and interhospital drug-resistant and biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, 26(7), p.802-814. 2020.
- Aruhomukama, D. C. F. N. et al. *bla*_{VIM}- and *bla*_{OXA}-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda **BMC Infect Dis**. 2019; 19: 853. Published online 2019 Oct 16. doi: 10.1186/s12879-019-4510-5.
- Brasiliense D. et al. Diversity of metallo- β -lactamase-encoding genes found in distinct species of *Acinetobacter* isolated from the Brazilian Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2019; 114: 190020. Published online 2019 May 30. doi: 10.1590/0074-02760190020
- Bush, K. P. A. B. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clin Microbiol Rev**. 2020 Apr; 33(2): e00047-19. Published online 2020 Feb 26. doi: 10.1128/CMR.00047-19.
- Castilho, S. R. A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: **Molecular and drug susceptibility profiles**. PLoS One, 12(5), e0176790. (2017).
- Chen, W. et al. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, US, v.11, p. 2495— 2500. 2015.
- Curcio, D.J. Antibiotic prescription in intensive care units in Latin America. **Rev. argent. Microbiol., Buenos Aires**, v.43, n. 3, p.203-211, jun./set., 2011.
- Duan, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental research**, 109(5), p.511-517. 2009.
- Gollino, G. P. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from southern Brazil. **Rev. Epidemiol. Controle Infecç. Santa Cruz do Sul**, Jan-Mar;11(1):26-31. 2021.

Hernández-Gómez, C. et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. **Biomédica, Colômbia**, v.34, n.1, p.91- 100, abril, 2014.

Héritier C.; Poirel L.; Lambert T.; Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother** 49: 3198 –3202. 2005.doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3198-3202.2005>

Higgins P.G, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. 2009. OXA143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother** 53:5035–5038. 2009. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00856-09>

Higgings, P. G. Inclusion of OXA-143 oligonucleotídeos in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdam**, v. 35, p. 305-314, Mar. 2010.

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

Jácome, P. R. L. A. et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare associated infections. **Journal of Medical Microbiology** , v. 65, p. 1-8, 2016.

Kurihara, M. N. L. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2020; 53: 20200248.

Labarca, J. A. et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–17, 27 ago. 2014.

Lancet. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. v.399. 10325. p. 629-655. Jan. 2022 doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Leal, N. C. et al. Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. **Front Microbiol.** 2020; 11: 1176. Published online 2020 Jun 17. doi: 10.3389/fmicb.2020.01176

Oliveira, E. A. et al. High rate of detection of OXA-23-producing *Acinetobacter* from two general hospitals in Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** Vol.:52:e20190243: 2019 doi: 10.1590/0037-8682-0243-2019.

Opazo A, Domínguez M, Bello H, et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J Infect Dev Ctries**; 6:311–16. 2012. doi: 10.3855/jidc.2310.

Poirel, L.; Walsh, T. R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.70 p.119–123. 2011.

Ribeiro, P.C.S. et al., Phenotypic and molecular detection of the *blaKPC* gene in clinical isolates from patients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infect. Dis.** 16:737. 2016.

Soltani, R., Ehsanpoor, M., Khorvash, F., Shokri, D. Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria causing nosocomial urinary tract infections in an Iranian referral teaching hospital. **J Res Pharm Pract.**, Irã, v.3, n.1, p.6-11, jan./mar., 2014.

Tamar, G. et al. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 dedicated hospital. **Infection Prevention in Practice** 3. v.3(1), march, 2021. 100113. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2021.100113>

Wirth, F.W. et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from southern Brazil. **Brazilian Journal of infectious diseases**, Salvador, v.13, n.3, p.170-172, jun., 2009.

Woodford, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 351–353, 2006.

6 CONCLUSÕES

- a) Os resultados obtidos do estudo descrevem que o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos está relacionado à resistência bacteriana aos carbapenêmicos nos 33 isolados bacterianos de *Acinetobacter* spp. de hospital terciário Recife-Pernambuco, assim foram considerados como isolados MDR;
- b) Os sítios de isolamento bacterianos de *Acinetobacter* spp. mais frequentes foram de secreção traqueal, corrente sanguínea, ponta de cateter, secreção biliar, líquido pleural, tecido e urina respectivamente;
- c) Quanto à detecção genética dos genes codificantes de oxacilinases: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-143-like} e *bla*_{OXA-23-like} foram as mais frequentes no estudo, com destaque para *bla*_{OXA-143-like} que apresentou um padrão diferente dos dados prévios em outros estudos no Brasil e no mundo;
- d) Em relação à ocorrência do gene *bla*_{VIM} ocorreu com frequência baixa nos isolados *Acinetobacter* spp. estudados, enquanto não foram detectados os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP};
- e) A detecção da β -lactamases KPC, neste estudo foi detectada uma frequência de 5,71%, considerada índice baixo quando comparada a outros estudos do Brasil;
- f) A análise filogenética identificou diversidade genética e heterogeneidade entre os 35 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., sendo identificado dois clones, clone 1 (isolados A32, A88 e A92) e o clone 2 (isolados A33, A47 e A48).

REFERÊNCIAS

- Aliramezani, A. et al. Clonal relatedness and biofilm formation of OXA-23- producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. **Microbial Pathogenesis**, London, US, v.99, p. 204-208, 2016.
- Al-Hamad A. et al. Molecular characterization of clinical and environmental carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a hospital of the Eastern Region of Saudi Arabia. **J Infect Public Health**. 13(4), p.632-6. 2020
- Ambler, R. P. The Structure of Beta-Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANVISA -. Patient Safety and Quality of Health Services Newsletter. **National Health Surveillance Agency**. 2019.
- Araujo Lima, A. V. et al. Occurrence and diversity of intra-and interhospital drug-resistant and biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, 26(7), p.802-814. 2020.
- Bergogne-Berezin, E., Towner, K. J. American Society for Microbiology *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p. 148-165, 1996.
- Biglari, S. et al. Molecular characterization of carbapenemase and cephalosporinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary medical centre in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, GB, v.64, p. 53-58, 2015.
- Blair, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. jan.v.13, 2014. Doi:10.1038/nrmicro3380.
- Bonomo1, R., Szabo, A. Szabo, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**. 43, p.49–56. 2006. Doi: 1058-4838/2006/4305S2-0003\$15.00.
- Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.
- Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- Bush, K. P. A. B. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clin Microbiol Rev**. 2020 Apr; 33(2): e00047-19. Published online 2020 Feb 26. doi: 10.1128/CMR.00047-19.
- BrCAST - Testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp. **Nota Técnica Conjunta CGLAB, BrCAST e ANVISA nº 347/2021**: – 2021. Disponível em: <http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/01/NOTA-TECNICA-ACINETOBACTER-2021-pdf.pdf>

Cavalcanti, C. L. B. Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos. 109 f. **Dissertação de Mestrado**-Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

Chen, W. et al. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, US, v.11, p. 2495— 2500. 2015.

Chuang, Y.C. et al., Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* Complex on Clinical Outcomes of Patients with *Acinetobacter* Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, 52(3):352–360. 2011.

Dijkshoorn L.; Nemec A.; Seifert H.; An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Ver Microbiol**. Dec;5(12).p.939-51. 2007.

Duan, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–517, jul. 2009.

Evans, B. A.; Amyes, S. G. B. OXA-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 241-263, 2014.

Fournier, P.E.; Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**.; 42:692–92006. Doi: 10.1086/500202.

Gian, D. C.; Marcelo, C. A. Perfil epidemiológico do *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenems num hospital do interior mineiro. **Revista Família, Ciclos de Vida e Saúde no Contexto Social**. v.4(3). : 2318-8413. 2016. Disponível em: Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=497950400005>.

Harding, C. M. et al. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not Surface Associated Motility. **mBIO**, v.4, p.1-10, 2013.

Henriksen S.D. Moraxella, *Acinetobacter*, and the Mimeoae. **Bacteriol Rev**. Dec;37(4):522-61. doi: 10.1128/br.37.4.522-561.1973. PMID: 4203395; PMCID: PMC413833. 1973.

Higgings, P. G. Inclusion of OXA-143 Oligonucleotídeos in a Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, p. 305-314, Mar. 2010.

Howard, A. et al. *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v.3, p. 243–250; 2012.

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

Jácome, P. R. L. A. et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer

patients with healthcare associated infections. **Journal of Medical Microbiology** , v. 65, p. 1-8, 2016.

Jácome, P.R.L.A. Estudo Epidemiológico e Molecular de Infecções Ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* e *Acinetobacter spp.* em Pacientes com Neoplasias Sólidas, Internados em um Hospital De Recife-PE. 169f. **Tese de Doutorado** - Doutorado em Medicina Tropical – Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

Kobs, V. C. et al. The role of the genetic elements bla_{OXA} and ISAb₁ in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v.49, p.433-440, 2016.

Koulenti D., Tsigou E., Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Jun. 2016.DOI 10.1007/s10096-016-2703-z.

Lancet. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. v.399. 10325. p. 629-655. Jan. 2022 doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Montero, J. G.; Villar, R. A. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 23:332–339. 2010. DOI:10.1097/QCO.0b013e32833ae38b.

Mulvey, M. R., Simor, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? **Canadian Medical Association Journal**. 180(4). p. 408-415. 2009.

Neves, R. P. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. **Tese de Doutorado**. 100f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Oliveira, E. A. et al. High rate of detection of OXA-23-producing *Acinetobacter* from two general hospitals in Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** Vol.:52:e20190243: 2019 doi: 10.1590/0037-8682-0243-2019.

Opazo, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, IT, v.6, p.311- 316, 2012.

Pfeifer, Y. et al.. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology - Elsevier**. 300 p.371–379, 2010. doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.005.

Poirel, L.; Walsh, T. R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.70 p.119–123. 2011.

Rice, L. B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. **Mayo Clin Proc.** 87(2). p.198-208. 2012. doi:10.1016/j.mayocp.2011.12.003.

Rocha, I. V. Identificação de mecanismos de resistência antimicrobiana de bactérias gram negativas prevalentes em superfícies e hemoculturas de unidade de terapia intensiva em Caruaru-PE. 109 p. **Dissertação de Mestrado** – Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

Tamar, G. et al. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 dedicated hospital. **Infection Prevention in Practice** 3. v.3(1),march, 2021. 100113. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2021.100113>

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Winn, J.R.W.C., et al. As Enterobacteriaceae e Bacilos GramNegativos Não-fermentadores. In: Koneman Diagnostico Microbiológico, **Texto e Atlas Colorido. 6^a ed. Guanabara Koogan**, Brasil, p.208-386. 2008.

Turton, J. F. et al. The role of ISAbal1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol.** 258: 72–77, 2006. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 373–383, 2006.

Winn, J.R.W.C., et al. As Enterobacteriaceae e Bacilos GramNegativos Não-fermentadores. In: Koneman Diagnostico Microbiológico, **Texto e Atlas Colorido. 6^a ed. Guanabara Koogan**, Brasil, p.208-386. 2008.

Wirth, F.W. et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from southern Brazil. **Brazilian Journal of infectious diseases**, Salvador, v.13, n.3, p.170-172, jun., 2009.

Woodford, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.27, p. 351-353, Jan. 2006.

Yigit, H., et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;45(4). p.1151-61. 2001. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.

Yum, J. H. et al. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla_{VIM-2} gene cassettes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.49. p. 837–840, 2002.