



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

ALINE MIRELY SOUSA ALBUQUERQUE

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER SPP.* EM UM HOSPITAL DE RECIFE
-PE**

Recife

2021

ALINE MIRELY SOUSA ALBUQUERQUE

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER SPP.* EM UM HOSPITAL DE RECIFE
-PE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

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

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A345i Albuquerque, Aline Mirely Sousa.
Investigação de genes de resistência aos aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* em um hospital de Recife-PE / Aline Mirely Sousa Albuquerque. – 2021.
69 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021.
Inclui referências e apêndices.

1. Acinetobacter. 2. Aminoglicosídeos. 3. Metilases de modificação do DNA. 4. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-160)

ALINE MIRELY SOUSA ALBUQUERQUE

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER SPP.* EM UM HOSPITAL DE RECIFE
-PE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para obtenção do título de mestre em Medicina tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Data de aprovação: 18/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

(Examinador interno)

Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

(Examinador externo)

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

(Examinador externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida e por me dar forças e me guiar até aqui. Aos meus pais, Esdras e Edilenna, e meus irmãos, Beatriz e Esdras Filho, por sempre confiarem em mim, me incentivarem e serem todo meu alicerce. E a meu namorado Alysson, por estar sempre presente me motivando para dar meu melhor e nunca sair do meu lado.

A minha orientadora Profa. Maria Amélia, por toda paciência e ensinamentos. Me recebeu em seu laboratório de braços abertos mesmo sem me conhecer. Serei extremamente grata pela forma que me aceitou e me guiou até aqui.

A todos do laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, em especial a Jailton Lobo e Luciano Brainer. E aos amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana: Weverton Alves, Erica Oliveira e Elizabeth Bispo.

A minha turma de pós-graduação, em especial Cristyell Aranda, Adamo Brito e Weverton Alves.

A meus familiares e amigos que sempre me apoiam e que foram pacientes nessa jornada.

Por fim, agradeço a cada um que fez parte dessa trajetória, mesmo que não esteja listado aqui, mas que foram essenciais, todo meu agradecimento.

RESUMO

O *Acinetobacter spp.* são patógenos oportunistas, estando associados a infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonia, infecções de corrente sanguínea, pele e tecidos moles, trato urinário e infecções de feridas. Eles conseguem desenvolver resistência a antimicrobianos rapidamente atuando através de vários mecanismos como degradação enzimática de fármacos, modificação de alvos, bombas de efluxo e defeitos de permeabilidade. A degradação enzimática dos aminoglicosídeos ocorre através de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) e metilases 16S RNAr. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e identificar a presença de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e de metilases 16S RNAr em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*, provenientes de um hospital de Recife-PE e o seu perfil clonal. Foram selecionados 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes a um ou mais aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados em 2018. Posteriormente, os isolados foram submetidos à Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para detecção dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia*) e metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*), e Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) para determinação do perfil clonal. Dos três genes de EMAs estudados, apenas as nucleotidiltransferases foram encontradas entre os isolados, distribuídos entre 48% dos isolados. O *ant(3'')-Ia* foi o gene mais prevalente, encontrado em 43% dos isolados, seguido por *ant(2'')-Ia* com menos de 1%, detectado em apenas três isolados. O gene *aac(6')-Ib* não foi detectado em nenhum isolado. Entre os genes que codificam as metilases, o *armA* e o *rmtC* foram os únicos encontrados, representando 80% e 57% dos isolados, respectivamente. E os genes *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* não foram encontrados nos isolados estudados. A tipagem molecular por ERIC-PCR demonstrou a disseminação de dois clones no hospital. Diante disso, os resultados do presente estudo demonstram a importância do rastreamento de genes de resistência e um alerta para medidas de controle e uso racional de antimicrobianos, visto que este trabalho demonstrou a presença de múltiplos genes de resistência em seus isolados.

Palavras-chaves: *Acinetobacter*; Aminoglicosídeos; metilases de modificação do DNA; enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.

ABSTRACT

Acinetobacter spp. are opportunistic pathogens and are associated with serious nosocomial infections, including pneumonia, bloodstream, skin and soft tissue infections, urinary tract and wound infections. They are able to develop resistance to antimicrobials quickly by acting through various mechanisms such as enzymatic drug degradation, target modification, efflux pumps and permeability defects. Enzymatic degradation to aminoglycosides occurs through aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) and 16S RNAr methylases. With this, the objective of this work was to evaluate the susceptibility profile to aminoglycosides and to identify the presence of aminoglycoside-modifying enzymes genes and 16S RNAr methylases in clinical isolates of *Acinetobacter spp.*, from a hospital in Recife-PE and their profile clonal. 35 isolates of *Acinetobacter spp.* resistant to one or more aminoglycosides (gentamicin and amikacin), from patients in a tertiary hospital in Recife-PE, were collected in 2018. Subsequently, the isolates were subjected to the Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect the genes of modifying enzymes aminoglycosides (*aac (6') - Ib*, *ant (2'') - Ia* and *ant (3'') - Ia*) and RNAr 16S methylases (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*), and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) to determine the clonal profile. Of the three AMEs genes studied, only nucleotidyltransferases were found among the isolates, distributed among 48% of the isolates. The *ant (3'') - Ia* was the most prevalent gene, found in 43% of the isolates, followed by *ant (2'') - Ia* with less than 1%, detected in only three isolates. The *aac (6') - Ib* gene was not detected in any isolate. Among the genes encoding methylases, *armA* and *rmtC* were the most commonly found, representing 80% and 57% of the isolates, respectively. And the *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* and *rmtG* genes were not found in any of the studied isolates. Molecular typing by ERIC-PCR demonstrated the spread of two clones in the hospital. In view of this, the results of the present study demonstrate the importance of screening resistance genes and a warning for measures of control and rational use of antimicrobials, since this study have the presence of multiple resistance genes in their isolates.

Keywords: *Acinetobacter*; aminoglycosides; Site-Specific DNA-Methyltransferase; aminoglycoside-modifying enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores de virulência presentes no <i>Acinetobacter baumannii</i> .	15
Figura 2 -	Antimicrobianos aminoglicosídeos.	20
Figura 3 -	Mecanismo de captação de aminoglicosídeos por células bacterianas Gram-negativas e inibição de síntese de proteínas.	22
Figura 4 -	Locais de modificação das acetiltransferases (1, 2', 3 e 6') em fármacos aminoglicosídeos.	23
Figura 5 -	Modificação química da amicacina catalisada pela fosfotransferase APH (3').	24
Figura 6 -	Modificação química da estreptomina catalisada pelo nucleotidiltransferase ANT (6).	24
Figura 7 -	Mecanismos de metilação de resíduos G1405 e A1408 em rRNA 16S por aminoglicosídeos.	25
Figura 8 -	Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.	31
Figura 9 -	Distribuição dos pacientes hospitalizados por unidades de internação.	36
Figura 10 -	Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de <i>A.baumannii</i> de um hospital público de Recife-PE, Brasil.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos isolados de <i>Acinetobacter spp.</i> selecionados para o estudo.	29
Tabela 2 -	Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores das EMAs.	32
Tabela 3 -	Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases.	33
Tabela 4 -	Distribuição de genes de resistência de EMAs e seus respectivos fenótipos de suscetibilidade	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC	Acetiltransferases
AceI	Proteína de efluxo de clorexidina do <i>Acinetobacter</i>
AMP	Monofosfato de adenosina
ANT	Nucleotidiltransferases
APH	Fosfotransferases
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)
EGI	Emergência geral
EMAs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
EMB	Ágar eosina azul de metileno
ESBL	Enterobactérias produtoras de beta-lactamases
HA	Ágar Herellea
LAM	Leeds Acinetobacter Medium
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MATE	Família de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas
MFS	Superfamília de facilitador principal
OMPs	Proteínas da membrana externa
PAV	Pneumonia associada a ventilação mecânica
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Superfamília RND	Superfamília resistência-nodulação-divisão
SMR	Pequenos transportadores de resistência a múltiplas drogas
SAM	S- adenosil- L- metionina
UCO	Unidade Coronariana
UTI	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	<i>ACINETOBACTER SPP</i>	14
2.2	EPIDEMIOLOGIA E RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS EM <i>ACINETOBACTER SPP</i>	16
2.3	AMINOGLICOSÍDEOS.....	18
2.3.1	Aspectos gerais.....	18
2.3.2	Mecanismo de ação.....	20
2.4	ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS.....	21
2.5	METILASES.....	24
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	29
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	30
4.3	CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	31
4.3.1	PCR dos genes que codificam as EMAs.....	31
4.3.2	PCR dos genes que codificam metilases.....	32
4.4	CONSENSO INTERGÊNICO REPETITIVO ENTEROBACTERIANO (ERIC-PCR).....	33
4.5	SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS NTIMICROBIANOS.....	35
5.2	INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS E METILASES.	36
5.3	TIPAGEM MOLECULAR DO <i>ACINETOBACTER SPP</i>	38
6	CONCLUSÕES.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Acinetobacter* são cocobacilos gram-negativos, encontrados em ambientes úmidos, incluindo solo e áreas úmidas, lagoas, estações de tratamento de água, águas residuais e até água do mar; também podendo ser encontrados em animais e alimentos. São patógenos associados a infecções relacionadas à saúde, incluindo pneumonia, infecções de corrente sanguínea, pele e tecidos moles, trato urinário e infecções de feridas, além de meningite (Doughari, 2011; Lee et al, 2017).

A espécie mais comumente associada a infecções hospitalares é o *Acinetobacter baumannii*. Este patógeno é classificado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas como um dos seis micro-organismos mais importantes resistentes a antimicrobianos em hospitais em todo o mundo (Antunes, 2015). No Brasil, o *Acinetobacter spp* está em quarto lugar como causador de infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres centrais (ANVISA, 2017). No estado de Pernambuco, o *Acinetobacter* está entre as espécies gram-negativas não fermentadoras, a que mais causou infecção de corrente sanguínea em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adulto e neonatal em 2019 (ANVISA, 2019).

Acinetobacter baumannii consegue desenvolver resistência a antimicrobianos rapidamente atuando através de vários mecanismos como degradação enzimática de fármacos, modificação de alvos, bombas de efluxo e defeitos de permeabilidade. A inativação dos fármacos ocorre principalmente através de beta-lactamases, Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs) e metilases de 16S RNAr (Shin, 2017).

As EMAs atuam catalisando uma modificação nos grupos químicos -OH ou -NH₂ do núcleo da 2-desoxitreptamina ou porções açúcares dos fármacos aminoglicosídeos, impedindo que o fármaco se ligue às subunidades dos ribossomos. Elas podem ser classificadas em três classes: acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT). Em isolados de *Acinetobacter spp*. as taxas de resistência aos aminoglicosídeos clinicamente úteis são encontradas mais frequentemente do que na maioria dos outros grupos de patógenos (Becker, 2013).

A inativação dos aminoglicosídeos também pode ocorrer pela ação das 16S RNAr metiltransferases, o que acarreta resistência aos aminoglicosídeos através da modificação de resíduos específicos de nucleotídeos de rRNA, bloqueando os aminoglicosídeos de se ligar ao seu alvo (Doi, 2016).

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

2 REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1 ACINETOBACTER SPP.

O gênero *Acinetobacter* inclui mais de 50 espécies de cocobacilos gram-negativos que não fermentam glicose, imóveis, oxidase negativos, catalases positivo, e estritamente aeróbicos. São facilmente cultivados em laboratório. Em ágar sangue, as colônias mostram morfologia e tamanho típicos: sem pigmentação, de cor branca ou creme, liso ou mucóide (quando a cápsula está presente), opaca, 1-2 mm de diâmetro (depois de 18-24 horas de incubação a 37°C). Em ágar eosina azul de metileno (EMB), as colônias são azuladas a cinza azulado, no ágar Herellea (HA) apresentam a cor lavanda pálida, enquanto no Leeds Acinetobacter Medium (LAM) as bactérias são de coloração rosada sobre um fundo roxo (Doughari, 2011).

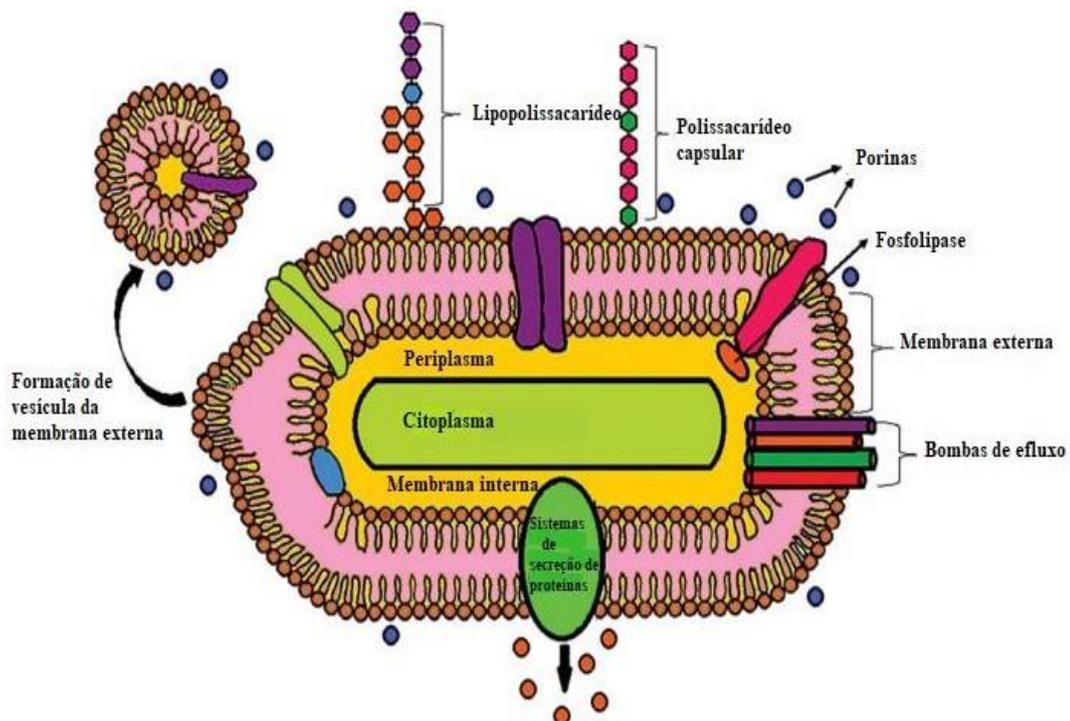
Estes micro-organismos se adaptam a várias temperaturas e são capazes de sobreviver em superfícies abióticas. Eles são encontrados em ambientes úmidos, incluindo solo e áreas úmidas, lagoas, estações de tratamento de água, águas de tanques para pisciculturas, águas residuais e até água do mar. Podem também ser encontrados em animais e alimentos. Algumas espécies como *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis* e *A. pittii*, foram encontradas em vegetais, carne, laticínios e pele humana (Lee et al, 2017).

A sobrevivência ambiental de *A. baumannii* está relacionada à presença de polissacarídeos capsulares circundando a célula inteira e fornecendo defesa contra o meio ambiente e são capazes de resistir à dessecação ou persistir em ambientes secos. *A. baumannii* também é capaz de bombear ativamente clorexidina, um antisséptico utilizado contra uma ampla gama de bactérias ao romper as membranas celulares. A proteína de efluxo para clorexidina do *Acinetobacter* (AceI) é responsável por tal bombeamento, possivelmente promovendo a sobrevivência em condições estressantes (Moubareck, 2020).

São patógenos oportunistas, sendo as espécies mais comuns para causar infecções o *A. baumannii*, seguidas por *A. nosocomialis* e *A. pittii*, sendo a *A. baumannii* a mais virulenta de todas as espécies. Esse gênero está associado a infecções hospitalares incluindo pneumonia, infecções de corrente sanguínea, pele e tecidos moles, trato urinário e infecções de feridas, além de meningite. A espécie mais comumente associada a essas infecções é o *A.baumannii*. Sua aquisição e infecção geralmente ocorre através de cirurgias, trauma, queimaduras, parto prematuro, internação prévia, permanência em uma UTI, tempo de internação, ventilação mecânica e uso de cateteres (Almasaudi, 2018).

A patogenicidade deste micro-organismo é atribuída a seus fatores de virulência, como: proteínas da membrana externa (OMPs), como a OmpA, que além da função de transporte como porina, também está envolvido na invasão e indução da apoptose celular; lipopolissacarídeo (LPS), importante para a resistência ao soro humano normal e juntamente com o pili, promove aderência às células hospedeiras; a cápsula, que cria uma barreira contra condições ambientais como secura e desinfecção, e reações do sistema imunológico como fagocitose; enzimas como fosfolipases, que possuem atividade lipolítica contra os fosfolipídios das membranas celulares do hospedeiro; produção de biofilme e detecção de quórum; sistema de aquisição de micronutrientes, como ferro (através de sideróforos), manganês e zinco; e sistemas de secreção de proteínas (Figura 1) (Moubareck, 2020).

Figura 1 - Fatores de virulência presentes no *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: Adaptado de Skariyachan et al, 2019.

Acinetobacter baumannii consegue desenvolver resistência a antimicrobianos rapidamente atuando através de vários mecanismos como degradação enzimática de fármacos, modificação de alvos, bombas de efluxo e defeitos de permeabilidade. A degradação enzimática ocorre principalmente através de beta-lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e metilases de 16S RNAr. Todas as quatro classes moleculares de beta-lactamases (A, B, C e

D) já foram encontrada em *A.baumannii*, sendo a classe D (chamadas oxacilinasas) um dos principais mecanismos de resistência a carbapenêmicos (Shin, 2017).

Além dos mecanismos enzimáticos, *Acinetobacter spp.* consegue desenvolver resistência aos antimicrobianos de outras formas. Os sistemas de efluxo de *A. baumannii* são codificados por genes cromossômicos responsáveis pela resistência a vários agentes antimicrobianos em caso de superexpressão. Quatro categorias de bombas de efluxo já foram identificadas em *A.baumannii*: superfamília RND (superfamília resistência-nodulação-divisão), MATE (família de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas), MFS (superfamília de facilitador principal) e SMR (pequenos transportadores de resistência a múltiplas drogas). Destes, o sistema RND está mais representado em *A. baumannii*, que inclui a bomba AdeABC, com papel fundamental na resistência a agentes antimicrobianos, principalmente aminoglicosídeos (Vrancianu, 2020).

A diminuição da permeabilidade da membrana celular é um mecanismo não enzimático de resistência que pode aumentar a resistência antimicrobiana. Em *A. baumannii*, a diminuição da densidade da porina da membrana (Omp22-23, Omp43, Omp44, Omp47, Omp33-36, Omp37 e CarO) está associada ao aumento da resistência aos carbapenêmicos. Como também, a OmpA que está associada aumento de resistência ao aztreonam, cloranfenicol e ácido nalidíxico (Smani et al, 2014; Sato et al, 2017).

No tratamento de *A.baumannii*, utiliza-se classes de antimicrobianos como carbapenêmicos, polimixinas e tigeciclina, mas as estratégias de tratamento atuais estão limitadas devido a propensão a desenvolver resistência. Os carbapenêmicos ainda são eficazes e um dos principais medicamentos de escolha em infecções por *A.baumannii*, porém está tendo um aumento cada vez maior de cepas resistentes aos carbapenêmicos. Devido a ocorrência de cepas multirresistentes, optam-se por utilizar uma terapia combinada, incluindo dois ou três diferentes classes de antimicrobianos, onde assim obtém-se um amplo espectro de cobertura e um efeito sinérgico contra o patógeno. Combinações recentes utilizam polimixina, sulbactam, tigeciclina e rifampicina e/ou carbapenêmicos (Lee et al, 2017; Skariyachan et al, 2019).

2.2 EPIDEMIOLOGIA E RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS EM *ACINETOBACTER SPP.*

Acinetobacter baumannii está comumente associado a Pneumonia Associada a Ventilação mecânica (PAV). Dentre os bacilos gram-negativos, a *Pseudomonas aeruginosa* é

o patógeno mais reportado em PAV, seguido pelo *A.baumannii* e *K.pneumoniae*, os quais juntamente são responsáveis por quase 80% de todos os casos de PAV (Sarda, 2019).

Em um estudo no continente Europeu, *A. baumannii* estava entre os isolados mais comuns detectados em pneumonias nosocomiais, e foi o micro-organismo dominante em casos de pneumonia nosocomial na Grécia e Turquia. Também foi o patógeno que predominou na fase final da PAV (Koulenti, 2016).

Acinetobacter baumannii também é responsável por mais de 12% dos casos de infecções da corrente sanguínea adquiridas em hospitais em UTI, com grandes variações geográficas: é frequente no sul da Europa, Ásia e América do Sul, enquanto é raro nos países do norte da Europa e Austrália (Montero, 2018).

Gupta et al (2019) ao analisar 411 hospitais nos Estados Unidos no período de 2013-2017, observou que de todos os isolados de *Acinetobacter spp.* analisados (n=19.325), 37,48% eram resistentes aos carbapenêmicos e 47,66% eram multirresistentes. A fonte mais comum de *Acinetobacter spp.* resistente foram culturas respiratórias, seguidas por infecções de pele e feridas.

Em pacientes submetidos a transplante de pulmão, Hyun Oh (2019) demonstrou que a maioria dos receptores de transplante tiveram infecção por *A.baumannii*, e estes infectados apresentaram uma taxa de mortalidade de 90 dias significativamente maior quando comparado aos pacientes não infectados.

Acinetobacter spp. já codificam uma diversidade de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Em isolados de *A.baumannii* foram prevalentes a presença dos genes *aph(3')-VIa* e *aph(3')-IIb*, como também a presença de metilases como o *armA* em três hospitais da Universidade de Teerã, no Irã (Aghazadeh et al, 2013).

Liu et al (2015) ao analisarem 60 isolados resistentes à amicacina, observaram que apenas o *armA* do gene metilase 16S RNAr foi prevalente (66,7 %), enquanto outras metilases 16S RNAr como *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* e *npmA* não foram detectados. As prevalências dos genes de enzimas modificadoras *aac(6')-Ib*, *ant(3'')-Ia* e *aph(3')-I* foram as mais prevalentes entre as EMAs.

No Brasil, um estudo realizado por Ballaben et al (2018) analisou a presença de genes metilases 16S RNAr (*rmtD* e *rmtG*) e EMAs (*aacA4*, *aacA1*, *aacC1*, *aphA6*, *aphA7*, *aph(3')-Iib*, *aadB*, *aadA1*, *addA2*, *aadA6*, *aadA7*, *strA* e *strB*) em isolados de bactérias gram-

negativas, incluindo não fermentadores como *A.baumannii* e *P. aeruginosa* em três estados no período de 2007 a 2014. Isolados de *A.baumannii* apresentaram apenas genes EMAs, como *aacA4*, *aacC1*, *aphA7*, *aadB*, *aadA1*, *aphA6*, e não detectou *rmtD* ou *rmtG*. O *rmtD* foi detectado apenas em *P.aeruginosa*, e *rmtG* em *K. pneumoniae*. O autor atribuiu que a resistência aos aminoglicosídeos de alto nível se deve a produção de metilases 16S RNAr ou a uma combinação de múltiplas EMAs.

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

2.3 AMINOGLICOSÍDEOS

2.3.1 Aspectos gerais

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas utilizados em infecções causadas por bacilos aeróbicos gram-negativos e alguns gram-positivos, podendo atuar de forma sinérgica contra gram-positivos quando utilizados em combinação com os beta-lactâmicos, favorecendo um aumento da captação. Como a captação do aminoglicosídeo depende do transporte ativo de elétrons, eles praticamente não têm atividade em bactérias anaeróbicas (Serio et al, 2018).

O primeiro aminoglicosídeo descoberto foi a estreptomicina na década de 1940, isolada do *Streptomyces griseus*, e é uma opção terapêutica até hoje no tratamento da tuberculose. Posteriormente vários outros aminoglicosídeos foram descobertos, como neomicina, tobramicina, gentamicina e amicacina. Com o advento de outras classes de antibióticos com menos efeitos colaterais, seu uso veio sendo diminuído até o aparecimento de bactérias multirresistentes, onde ressurgiu o interesse na classe, tendo a Plazomicina lançada em 2018 após quase 40 anos sem um novo aminoglicosídeo no mercado (Ramirez, 2010; Serio et al, 2018).

Estruturalmente eles são formados por um anel aminociclitol ligado a um ou mais amino açúcares através de ligações glicosídicas. Na maioria dos aminoglicosídeos, o grupo aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, que pode ser bissubstituída na posição 4 e 5, ou 4 e 6.

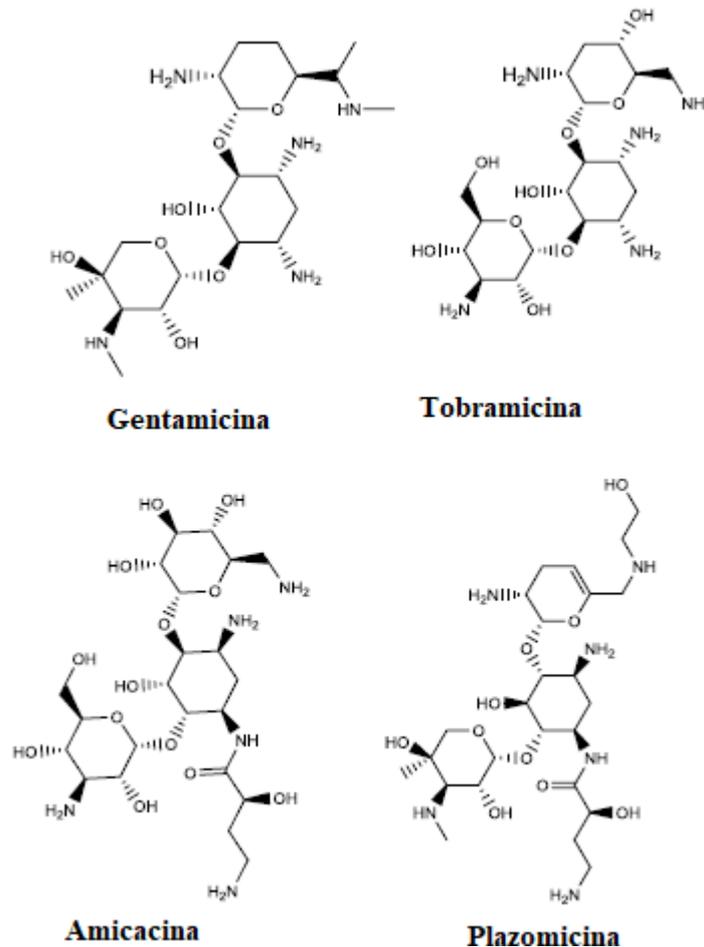
Os que se ligam na posição 4-5 são fármacos como neomicina e a maioria dos aminoglicosídeos se ligam na posição 4-6 como ampicacina, gentamicina e tobramicina. Existem exceções, como a estreptomicina, que é um fármaco que não se liga a 2-desoxi-estreptamina, e sim ao aminociclitol estreptidina (SILVA; CARVALHO, 2007).

São fármacos de amplo espectro presente no mercado em diferentes formas farmacêuticas, utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, respiratório, sepse, pneumonia e infecções de pele. Como também em doenças causadas por *Yersinia pesti* e *Francisella tularensis*, causadores da peste e tularemia, respectivamente (Krause et al, 2016).

Fatores que limitam o uso desses fármacos como primeira linha no tratamento de infecções bacterianas são seus efeitos colaterais, sendo a nefrotoxicidade e a ototoxicidade os mais comuns. Estes fármacos causam toxicidade dos sistemas vestibular ou coclear do ouvido interno em até 10% dos pacientes que recebem esses medicamentos por via intravenosa. A nefrotoxicidade ocorre em 5 a 15% dos pacientes em terapia, é geralmente reversível e pode ser influenciada pela farmacoterapia, como o esquema terapêutico, por exemplo (JOSPE-KARFMAN, 2020).

A mais nova proposta da classe é a plazomicina (figura 2), um aminoglicosídeo semissintético intravenoso recentemente aprovado, que apresenta uma potente atividade *in vitro* contra enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, como também, apresenta estabilidade às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs). Como os demais da classe, também deve-se ter cautela em relação a nefrotoxicidade e ototoxicidade (ELJAALY et al, 2019).

Figura 2 - Antimicrobianos aminoglicosídeos.



Fonte: Adaptado de Eljaaly et al, 2019.

2.3.2 Mecanismo de ação

Os aminoglicosídeos, diferentemente de outros inibidores da síntese proteica, agem através da combinação da captação juntamente com a inibição da síntese proteica, levando a morte celular bacteriana. Esta captação ocorre em três passos. O primeiro passo é sem gasto de energia e ocorre por uma interação eletrostática entre moléculas catiônicas dos aminoglicosídeos com a superfície aniônica dos lipopolissacarídeos e fosfolípidos nos gram-negativos, e fosfolípidos e ácidos teicóicos nos gram-positivos, aumentando a permeabilidade da membrana, favorecendo o acesso dos aminoglicosídeos (Becker, 2013; Ramirez, 2010).

As próximas fases da captação são dependentes de energia (fase I e fase II), pois a energia utilizada é gerada pelo transporte de elétrons para manter o potencial transmembrana. A fase I dependente de energia pode ser bloqueada por inibidores de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, e o pequeno número de aminoglicosídeos que atinge o citoplasma induz erros na síntese de proteínas, causando danos na membrana, facilitando uma maior entrada de aminoglicosídeos. Por fim, desencadeia a fase II dependente de energia onde a falha na síntese proteica compromete a integridade da membrana, levando a um ciclo autocatalítico de captação dos aminoglicosídeos, resultando em morte celular da bactéria (Becker, 2013; Ramirez, 2010).

Estando no citoplasma, os aminoglicosídeos exercem sua ação no ribossomo bacteriano, se ligando no local A (aminoacil) de decodificação na subunidade ribossômica 30S. Eles se ligam aos nucleotídeos na hélice 44 do rRNA 16S, favorecendo a saída forçada de resíduos A1492 e A1493, ocorrendo uma reorganização conformacional no rRNA e causando erros de codificação, interferindo no funcionamento normal da síntese proteica (Figura 3) (Fosso, 2014).

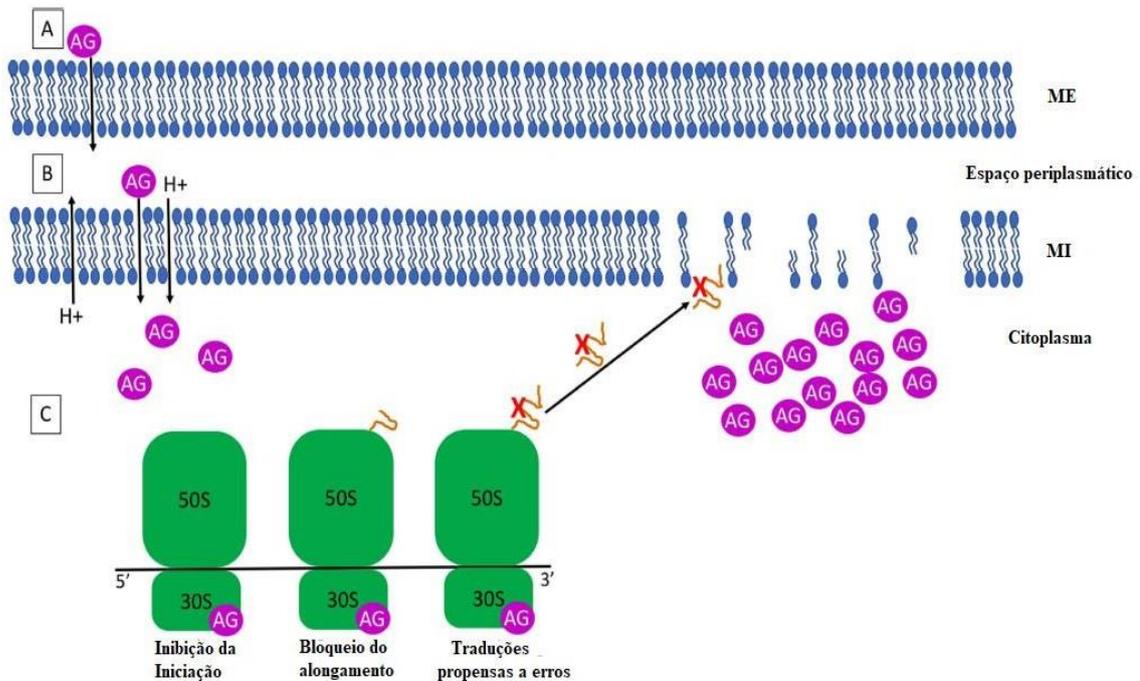
2.4 ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS

As bactérias anaeróbicas apresentam mecanismo natural e intrínseco de resistência aos aminoglicosídeos por serem desprovidas de cadeias transportadoras de elétrons. Em contrapartida, existem vários outros mecanismos envolvidos na resistência aos aminoglicosídeos, como alteração da permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo, modificação do alvo por mutação do rRNA 16S, metilação do rRNA 16S, e inativação do fármaco pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (Krause et al, 2016).

A inativação enzimática é a forma de resistência mais comum aos aminoglicosídeos. As EMAs são codificadas por plasmídeos, transposons e integrons, facilitando sua disseminação; e atuam catalisando uma modificação nos grupos químicos -OH ou -NH₂ do núcleo da 2-desoxitreptamina ou porções açúcares dos fármacos aminoglicosídeos, impedindo que o fármaco se ligue às subunidades dos ribossomos. Elas podem ser classificadas em três classes: acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT) (Labby, 2013).

Figura 3 - Mecanismo de captação de aminoglicosídeos por bactérias Gram-negativas e inibição da síntese de proteínas. (A) Carregado positivamente os aminoglicosídeos (AG) entram na célula via ligação eletrostática aos componentes carregados negativamente da membrana externa (ME), incluindo fosfolipídios e LPS em bactérias Gram-negativas ou ácido teicóico em bactérias Gram-positivas. Essa ligação permite o acesso do AG ao Espaço periplasmático. (B) Um pequeno número de AGs atravessa a membrana interna (MI) usando a força motriz do próton e entra no citoplasma de uma forma dependente da energia maneira. (C) No citoplasma, os

AGs ligam o rRNA 16S da subunidade ribossômica 30S, onde inibem o início da tradução, bloqueiam alongamento da tradução e induzem a uma tradução propensa a erros. Supõe-se que proteínas mal traduzidas causem danos ao membrana interna, facilitando a AG entrada no citoplasma.

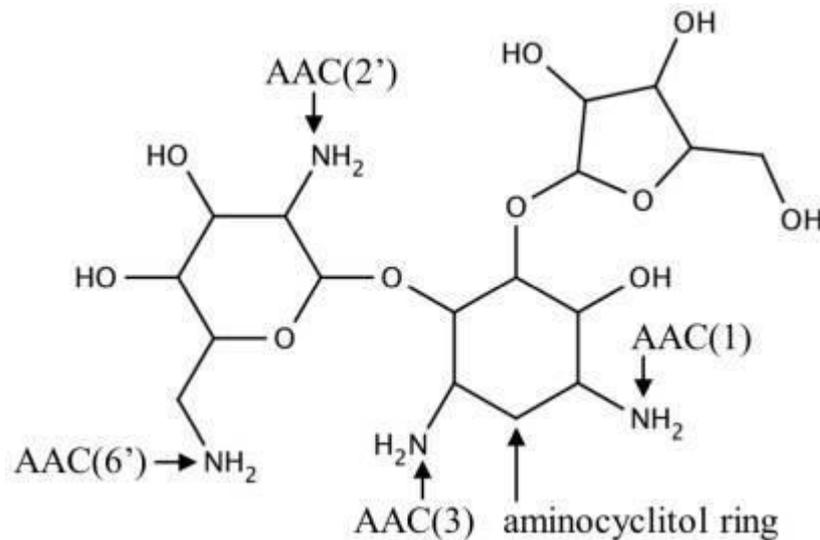


Fonte: Adaptado de Serio et al (2018).

Existem duas nomenclaturas distintas para as EMAs. A primeira baseia-se na ação enzimática, onde consiste em um código de três letras para identificar a atividade (AAC, APH ou ANT), seguido de um número entre parênteses que representa o local da modificação, um numeral romano que descreve que designa a subclasse e uma letra minúscula como identificador individual. O segundo baseia-se numa perspectiva genética, com três letras minúsculas para designar a atividade (*aph*, *aac*, *aad*), uma letra maiúscula para o local da modificação e um número para identificar os diferentes tipos de genes (Shaw et al, 1993; Becker, 2013).

As acetiltransferases (-NH₂) faz parte da superfamília de controle geral não-expressável (GCN5) relacionado as N-acetiltransferases (GNAT). Estas enzimas catalisam a transferência de um grupo acetil da acil coenzima A (acil-CoA) para um dos quatro grupos amino presentes no anel aminociclitol dos aminoglicosídeos (Figura 4). São divididas em quatro subclasses: AAC (1), AAC (2'), AAC (3) e AAC (6') (Favrot et al, 2016; Ud-Din, 2016).

Figura 4 - Locais de modificação das acetiltransferases (1, 2', 3 e 6') em fármacos aminoglicosídeos.



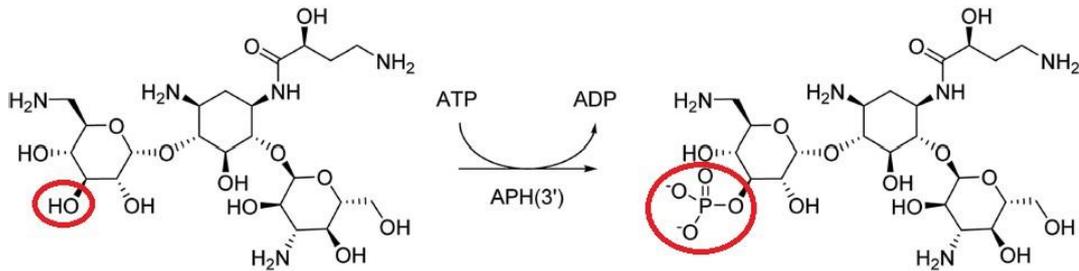
Fonte: Ud-Din, 2016.

As taxas de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos clinicamente úteis são encontradas mais frequentemente em isolados de *Acinetobacter spp.* do que na maioria dos outros grupos de patógenos. Diferentes tipos de acetiltransferases já foram detectados, como *aac* (3) -Ia, *aac* (3) -IIa, *aac* (6') - Ib, *aac* (6') - Iad, *aac* (6') - Im e *aac* (6') - II, sendo a *aac* (6') - Ib e *aac* (3) - Ia as mais comumente encontradas (Atasoy et al, 2015; Lin et al, 2015; Ruppé et al, 2015).

As fosfotransferases atuam transferindo a porção fosfato de ATP ou GTP para um grupo hidroxila (-OH) no anel aminociclitol dos aminoglicosídeos (Figura 5). Eles são divididos em subclasses, dependendo de qual hidroxila é modificada, incluindo assim sete enzimas: APH (2''), APH (3'), APH (3''), APH (4), APH (6), APH (7'') e APH (9) (Smith et al, 2019).

As enzimas APH (4) e APH (7) não são consideradas clinicamente importantes, e as enzimas APH (3') são as mais comumente encontradas, principalmente entre gram-negativos não fermentadores. Sendo a APH (3') - IIIa amplamente disseminada em gram-positivos juntamente com as enzimas da APH (2''), e APH (3') - I e VIa largamente disseminada entre gram-negativos. Em *Acinetobacter baumannii* são mais prevalentes as APH (3') Ia e APH (3') VIa (Becker, 2013).

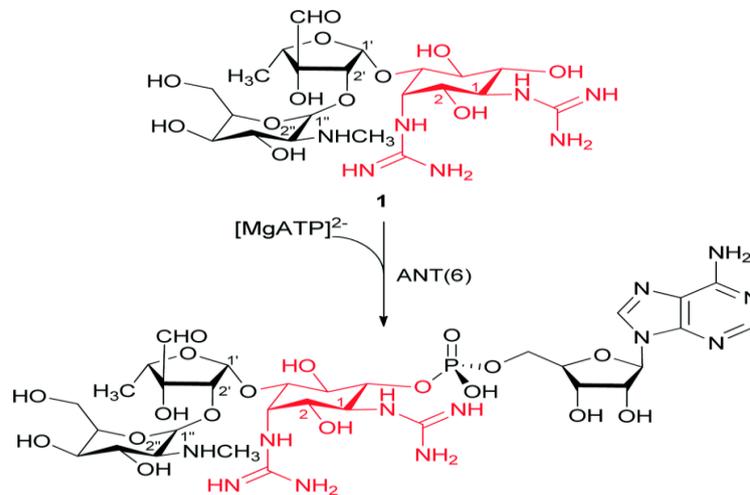
Figura 5 - Modificação química da amicacina catalisada pela fosfotransferase APH (3').



Fonte: Adaptado de Serio et al (2018).

As nucleotidiltransferases (ou adeniltransferases) são o menor grupo entre as AMES, e atuam transferindo um monofosfato de adenosina (AMP) do complexo MgATP para um grupo hidroxila (-OH) dos aminoglicosídeos (Figura 6). Eles contêm cinco classes existentes: ANT (2''), ANT (3''), ANT (4'), ANT (6) e ANT (9), sendo a ANT (3'') a mais comumente encontrada em isolados clínicos (Becker, 2012; Latorre et al, 2016).

Figura 6 - Modificação química da estreptomicina catalisada pelo nucleotidiltransferase ANT (6).



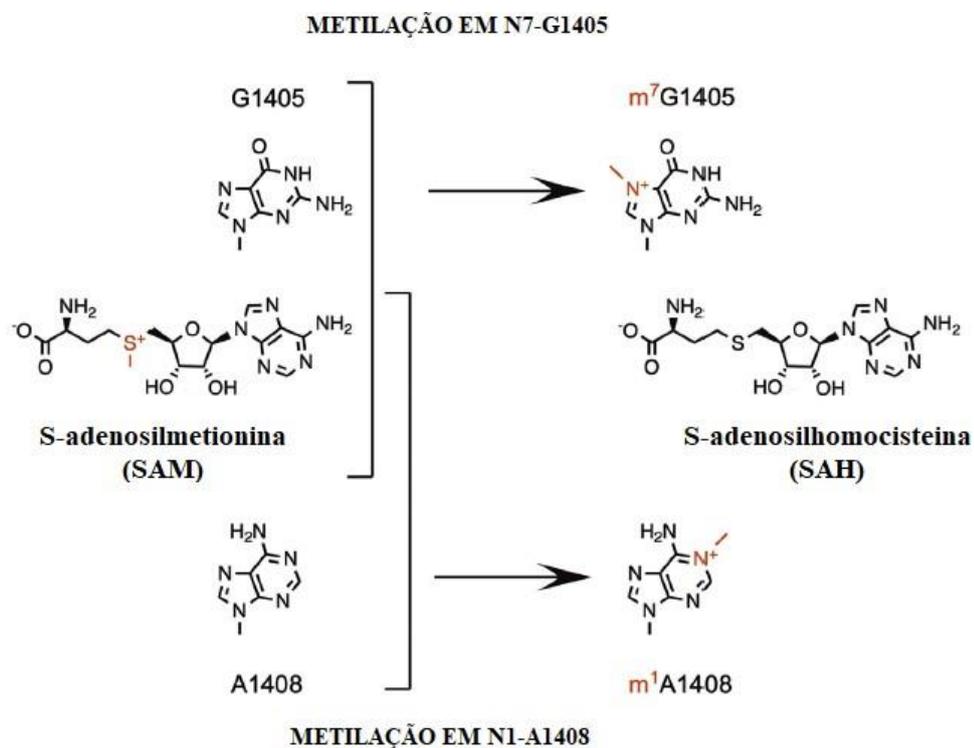
Fonte: Latorre et al, 2016.

2.5 METILASES

A ação das metilases 16S RNAr acarreta resistência aos aminoglicosídeos através da modificação de resíduos específicos de nucleotídeos de RNAr, bloqueando os aminoglicosídeos de se ligar ao seu alvo. Elas atuam por meio da metilação de um nucleotídeo no sítio de ligação do aminoglicosídeo do rRNA 16S (o sítio A) usando S- adenosil- L- metionina (SAM) como

um co-substrato. As metilases 16S RNAr de resistência aos aminoglicosídeos são divididas em duas famílias: aquelas que metilam na posição N7 do nucleotídeo G1405 (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD1, RmtD2, RmtE, RmtF, RmtG e RmtH) e aquelas que metilam na posição N1 de A1408 (NpmA) (Figura 7). N7-G1405 RMTases conferem resistência a 2-DOS-4,6-dissubstituídos, como amicacina, gentamicina e tobramicina, mas não a 2-DOS-4,5-dissubstituídos como neomicina. O N1-A1408 RMTase NmpA confere resistência a 2-DOS-4,5 e 4,6-dissubstituídos e a apramicina (Doi, 2016).

Figura 7 - Mecanismos de metilação de resíduos G1405 e A1408 em rRNA 16S por aminoglicosídeos.



Fonte: Adaptado de Wachino (2020).

Algumas bactérias, como actinomicetos, apresentam resistência intrínseca aos aminoglicosídeos através das 16S RMTases. Genes como Kmr, FmrO e Sgm modificam a posição N7 do nucleotídeo G1405 conferindo resistência aos 4,6-dissubstituídos como amicacina e gentamicina. Por outro lado, genes como KamA modifica a posição N1 do nucleotídeo A1408 conferindo resistência a praticamente todos os aminoglicosídeos (Wachino, 2012).

Até então sabia-se da resistência intrínseca pelas metilases, até a identificação do gene *RmtA* em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* coletados em hospitais japoneses em 1997, que demonstrou considerável similaridade (até 35%) com as metilases 16s rRNA de actinomicetos. Seguido em 2003 da detecção do gene *ArmA* carregado pelo plasmídeo conjugativo pIP1204 em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, corroborando com a existência de metilases adquiridas exogenamente. Sendo posteriormente descoberto outras metilases como *RmtB*, *RmtC*, *RmtD*, *RmtE*, *RmtF*, *RmtG*, *RmtH* e *NpmA* (Galimand, 2003; Yokoyama et al, 2003).

O *rmtB* foi identificado pela primeira vez em um isolado de *Serratia marcescens* de um paciente no Japão em 2002 (Doi et al, 2004). E, entre as metilases, a *rmtB* e *armA* são as mais prevalentes, distribuídas mundialmente em isolados clínicos de humanos e animais, tendo uma possível disseminação através da alimentação. Estão comumente presentes nas *Enterobacteriaceae* e nos bacilos não fermentadores como *Acinetobacter baumannii*, e estão frequentemente associados ao gene *blaNDM-1* (Wachino, 2012; Doi, 2016).

O *rmtC* foi inicialmente identificado em isolados de *Proteus mirabilis*, e apresenta um baixo nível de identidade com outras metilases mediadas por plasmídeos (*rmtA*, *rmtB* e *armA*) como pelas encontradas em actinomicetos (Wachino et al, 2006). É mais comumente identificado em enterobactérias, particularmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, e foi recentemente identificado em isolados clínicos de *A.baumannii* na Índia, Uruguai e no Brasil (Pereira et al, 2019); como também em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* da Índia (Rahman, 2015).

O *rmtD* foi a quinta metilase identificada, sendo encontrada em 2005 no estado de São Paulo em um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metalo-beta-lactamase, o SPM-1. O *rmtD* compartilha uma identidade moderada com *rmtA* e *rmtB* (40 e 42%, respectivamente) e é mais comumente encontrado na América do Sul (Doi et al, 2007).

Após o *armA*, *rmtB* e *rmtC*, o *rmtF* é o gene mais prevalente. Sua primeira identificação foi realizada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* em 2011 na França (Galimand, 2012), e posteriormente em outros países. E até agora só foi identificado em enterobactérias, e mais recentemente em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, onde neste isolado também foi identificado uma variação do *rmtF*, o *rmtF2* (Rahman et al, 2015).

O *npmA* também tem identificação limitada em alguns países e seus casos são considerados esporádicos quando comparado as demais metilases. É a única metilase que atua

em N1-A1408, sendo descoberto em 2003 em isolados de *Escherichia coli* em um paciente no Japão (Wachino, 2007).

O gene *rmtG*, teve o seu primeiro relato e designação no mundo descrito no Brasil, em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* coletadas em oito hospitais do estado de São Paulo. Cinco isolados continham o gene, até então desconhecido. Este gene compartilha 57 a 58% de similaridade com os genes *rmtD1* e *rmtD2*, respectivamente, e 36% com *rmtA*, *rmtB2* e *rmtF*, 35% com *rmtB1*, 29% com *rmtE*, 23% com *rmtC* e 22% com *armA* (Bueno et al, 2013).

Posteriormente, ainda na América do Sul, o *rmtG* foi detectado em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* no Chile (Poirel et al, 2014), sendo considerada até então uma metilase exclusiva da América do Sul. Até que em 2014 teve o primeiro relato de *rmtG* nos Estados Unidos em Miami, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* (Hu et al, 2014), seguido em 2015 do primeiro relato na Índia em isolados de enterobactérias (Filgona, 2015) e o primeiro relato na Europa em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* na Suíça proveniente de um paciente brasileiro (Mancini et al, 2018). Apesar disso, o *rmtG* ainda é considerado mais restrito a América do Sul.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e identificar a presença de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e de metilases 16S RNAr em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*, provenientes de um hospital de Recife-PE e o seu perfil clonal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* de um hospital de Recife no ano de 2018.
- Investigar a presença dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: acetiltransferases *aac(6')-Ib*, e nucleotidiltransferases *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia* em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*
- Investigar a presença dos genes metilases 16S RNAr: *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*
- Determinar o perfil clonal através da ERIC-PCR dos isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* e indicar a disseminação dos possíveis clones no ambiente investigado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Neste estudo foram selecionados 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes ou intermediários a um ou mais aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina), provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados em 2018. Os isolados foram classificados quanto o perfil de susceptibilidade antimicrobiana através da realização do sistema automatizado BD Phoenix® e a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Os isolados de *Acinetobacter spp.* foram mantidos congelados em estoque com glicerol a -20°C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular. Para as análises, as bactérias foram reativadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) incubadas por 48 horas em estufa a 37°C, semeadas em meio Luria Bertani (LB) e colocadas em estufa a 37°C por 24 horas. A tabela 1 resume as características dos 35 isolados selecionados.

TABELA 1 - Características dos isolados de *Acinetobacter spp.* selecionados para o estudo.

ISOLADOS	TIPO DE AMOSTRA	UNIDADE DE INTERNAÇÃO	GEN	AMI
A1	Sangue	EGI	R	R
A2	Secreção traqueal	UTI	R	R
A3	Sangue	EGI	R	R
A6	Sangue	UCO1	R	R
A8	Secreção traqueal	UTI	R	R
A9	Ponta de cateter	UTI	R	R
A10	Sangue	UCO1	R	R
A11	Secreção traqueal	UCO2	R	R
A13	Secreção traqueal	UTI	R	R
A14	Sangue	EGI	R	R
A15	Urina	Cardiologia	R	R
A16	Secreção traqueal	UCO1	R	R
A19	Sangue	EGI	R	I
A20	Sangue	UTI	R	R
A25	Secreção traqueal	UCO1	R	R

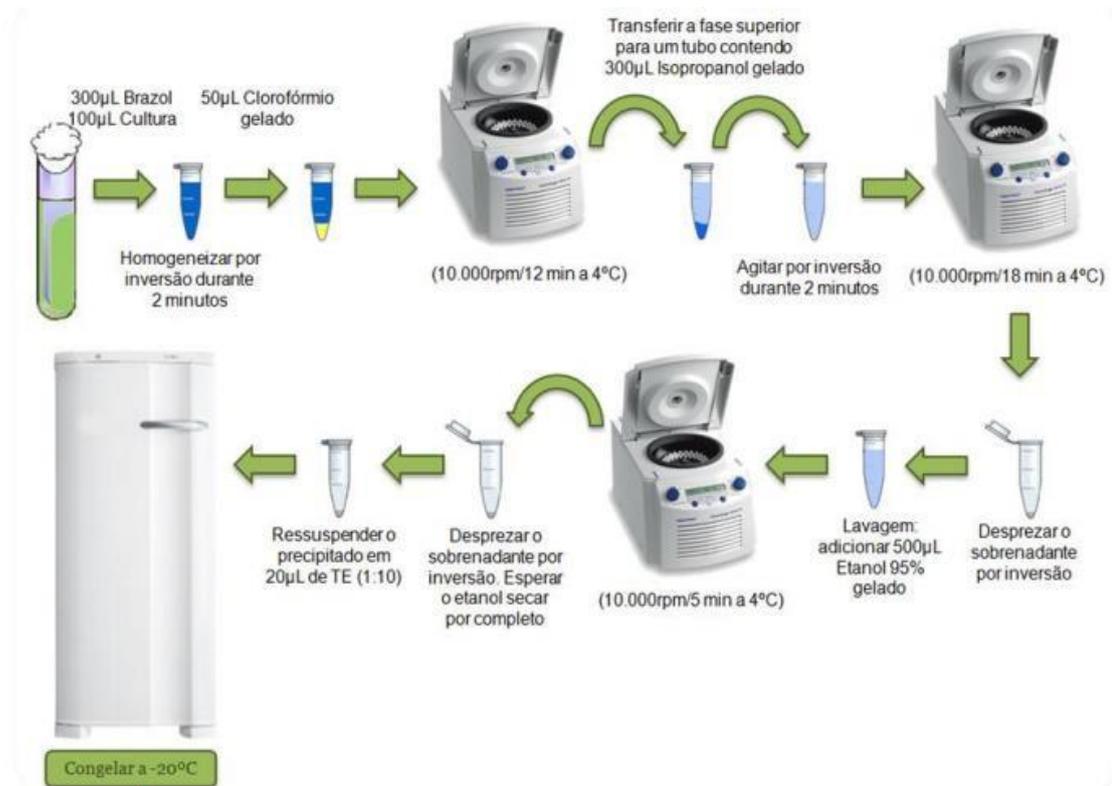
A26	Secreção traqueal	UTI	R	R
A32	Secreção traqueal	UTI	R	R
A33	Secreção traqueal	UTI	R	R
A37	Sangue	UTI	R	R
A42	Sangue	UCO1	R	R
A43	Secreção traqueal	UTI	R	R
A47	Secreção biliar	Clínica cirúrgica	R	I
A48	Secreção traqueal	UCO1	R	I
A49	Líquido pleural	EGI	R	R
A51	Ponta de cateter	UTI	R	R
A55	Ponta de cateter	UTI	R	I
A59	Secreção traqueal	UTI	R	R
A63	Secreção traqueal	UTI	R	I
A72	Secreção traqueal	UTI	R	S
A75	Ponta de cateter	UTI	R	R
A78	Secreção traqueal	UTI	R	R
A79	Secreção traqueal	UTI	R	R
A84	Tecido	Clínica vascular	R	R
A88	Secreção traqueal	UTI	R	R
A92	Sangue	UCO1	R	R

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

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

Após a incubação das colônias em caldo LB a 37°C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total dos isolados clínicos. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante (Figura 8). O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm.

Figura 8 - Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.



Fonte: Jacome, 2011.

4.3 CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

4.3.1 PCR dos genes que codificam as EMAs

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

0,5x. Posteriormente foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.3.2 PCR dos genes que codificam metilases

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

Tabela 2 - Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores das Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos.

Genes	Sequência do primer	Pares de base (pb)	Referências
aac(6')-Ib	5'-CAAAGTTAGGCATCACA-3' 5'-ACCTGTACAGGATGGAC-3'	540	Miró et al, 2013
ant(2'')-Ia	5'-ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGT-3' 5'-CTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG-3'	572	Miró et al, 2013
ant(3')-Ia	5'-TCGACTCAACTATCAGAGG-3' 5'-ACAATCGTGACTTCTACAGCG-3'	245	Miró et al, 2013

Tabela 3 - Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases.

Genes	Sequência do primer	Pares de base (pb)	Referências
armA	5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3' 5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3'	101	Berçot, 2011
rmtB	5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3' 5'-AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3'	171	Berçot, 2011
rmtC	5'-CAGGGGTTCCAACAAGT-3' 5'-AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3'	246	Berçot, 2011
rmtD	5'-GGAAAAGGACGTGGACA-3' 5'-TCCATCGATTCCACAGG-3'	171	Berçot, 2011
rmtF	5'-GCGATACAGAAAACCGAAGG-3' 5'-ACCAGTCGGCATAGTGCTTT-3'	589	Hidalgo et al., 2013
rmtG	5'-AAATACAGCGATGTGTGTCC-3' 5'-ACACGGCATCTGTTTCTTCC-3'	250	Bueno et al., 2013

4.4 CONSENSO INTERGÊNICO REPETITIVO ENTEROBACTERIANO (ERIC-PCR)

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

4.5 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Foi realizado o sequenciamento de dois genes que não continham controle positivo, o *ant(2)-Ia* e o *ant(3)-Ia* para confirmação dos genes identificados. O produto da PCR foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente purificado através do kit de purificação

de DNA Wizard (SV gel e PCR clean-up System) (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação o fragmento de DNA foi levado ao sequenciamento. Este apresentou resultado satisfatório e as sequências de nucleotídeos foram confrontadas com as sequências disponíveis em bancos de dados, usando os algoritmos BlastN e BlastX BlastNetwork disponíveis no NCBI. As sequências foram depositadas com código de acesso: MZ322621 (para o ant(2)-Ia) e MZ322622 (para o ant(3)-Ia).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

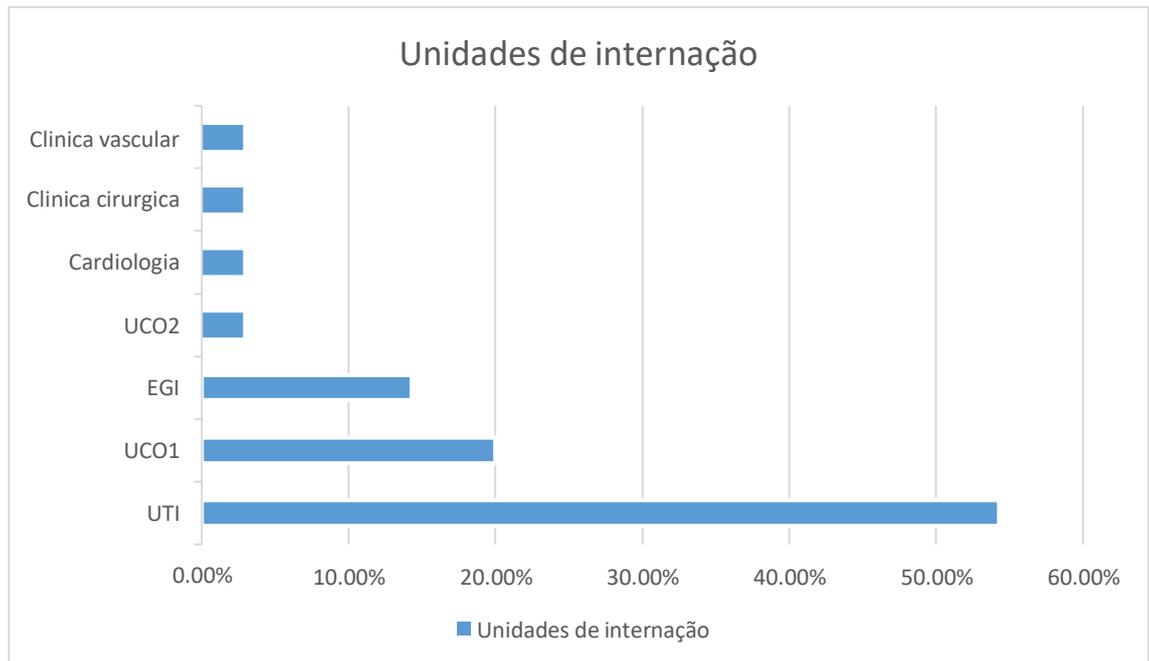
5.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Um total de 35 isolados de *Acinetobacter spp.* foram coletados de diferentes amostras clínicas, onde isolados provenientes de secreção traqueal e sangue tiveram maior frequência, correspondendo a 48,6% e 28,6%, respectivamente. Em seguida, as amostras clínicas menos frequentes foram pontas de cateter (11,4%), urina (2,8%), secreção biliar (2,8%), líquido pleural (2,8%) e tecido (2,8%).

Espécies de *Acinetobacter* estão entre os cinco patógenos que mais causam pneumonias adquiridas em hospitais e associadas a ventilação. Eles se manifestam mais comumente em infecções respiratórias ou em infecções de corrente sanguínea associadas ao cateter central, sendo menos frequentes em infecções de pele e trato urinário (Harding, 2018; Jean et al, 2020).

Resultados similares foram obtidos em outros estudos envolvendo isolados de *A.baumannii*. No estudo de Polotto (2019), 52% dos isolados bacterianos foram originados de aspirado traqueal, seguidos por pontas de cateter (22%), urina (8%), sangue (5%), biópsia (4%), secreções (3%), líquido pleural (2%) e outras amostras clínicas (escarro, líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar e medula óssea; 1% cada). No estudo de Santos (2020), foram 24 isolados de *A.baumannii* provenientes de um hospital público de Pernambuco, 33,3% foram obtidos de sangue e 16,7% de aspirado traqueal, seguidos de swab retal (16,7%), ponta de cateter (12,5%), urina (8,3%) e fluidos ascíticos (4,2%).

Os 35 isolados deste estudo foram coletados de pacientes hospitalizados em sete unidades de internação, dentre eles: unidade de terapia intensiva (UTI), unidade coronariana (UCO1 e UCO2), emergência geral (EGI), cardiologia, clínica cirúrgica e clínica vascular. A maioria dos isolados foram obtidos da UTI, representando a 54,4% do total, seguidos por UCO1 com 20%, EGI com 14,4%, e UCO2, Cardiologia, Clínica cirúrgica e Clínica Vascular com 2,8% cada.

Figura 9 - Distribuição dos pacientes hospitalizados por unidades de internação.

Em relação a resistência observada aos aminoglicosídeos, todos os 35 (100%) isolados foram resistentes a gentamicina, 29 (83%) foram resistentes a amicacina, 5 (14%) foram considerados intermediários a amicacina e apenas 1(3%) isolado foi sensível a amicacina.

5.2 INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS E METILASES

Dos três genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) estudados, onde dois genes foram as nucleotidiltransferases *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia*, e uma acetiltransferase, o *aac(6')-Ib*; apenas as nucleotidiltransferases foram encontradas entre os isolados, distribuídos entre 48% dos isolados. O *ant(3')-Ia* foi o gene mais prevalente, encontrado em 43% dos isolados, seguido por *ant(2)-Ia* com menos de 1%, detectado em apenas três isolados. O gene *aac(6')-Ib* não foi detectado em nenhum isolado como mostrado na Figura 9. Os genes para *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia* foram confirmados por sequenciamento. Entre os isolados de *Acinetobacter spp.* carreadores de genes de EMAs, apenas um isolado, o A19, apresentou dois genes simultaneamente, o *ant(2)-Ia* e o *ant(3)-Ia*.

Poucos são os relatos dos genes *ant(2')-Ia* (*aadB*) ou *ant(3')-Ia* (*aadA1*) em isolados de *Acinetobacter baumannii* no Brasil. Ballaben et al (2018) ao avaliar a resistência a amiglicosídeos de alto nível em bacilos gram-negativos não fermentadores, detectou em um isolado de *A.baumannii* a presença dos genes *aadB* e *aadA1* juntamente com outras EMAs.

Entretanto, Polotto (2019) ao pesquisar EMAs em isolados de *A.baumannii* provenientes de um hospital público de São José de Rio Preto, não detectou o gene *ant(2'')-Ia*, porém o *aac(6')-Ib* foi o segundo gene mais prevalente e o *ant(3')-Ia* não foi pesquisado. Mataruco (2015) também não detectou nenhuma nucleotidiotransferase em isolados de *A.baumannii.*, sendo considerado escasso os casos desse grupo em isolados de *Acinetobacter spp.* no Brasil.

Firmo (2019) detectou o gene *ant(2')-Ia* em isolados de *Enterobacter aerogenes* provenientes de um hospital terciário de Recife, demonstrando que tem a presença deste gene localmente. E, em isolados de *Acinetobacter spp.*, este estudo é o primeiro relato dos genes *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia* em Recife.

Entre os genes que codificam as metilases (Figura 10), o *armA* e o *rmtC* foram os únicos encontrados, representando 80% e 57% dos isolados, respectivamente. E os genes *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* não foram encontrados em nenhum dos isolados estudados. Entre os isolados carreadores de metilases, 17% (6/35) apresentaram apenas um gene, 51% (18/35) apresentaram dois genes simultaneamente. A associação mais encontrada foi entre *armA* e *rmtC*, totalizando 43% (15/35).

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

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

Em 2018, Bado et al. publicou o primeiro relato do gene *rmtC* em *Acinetobacter baumannii* no Uruguai, identificado em uma Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário, demonstrando que o gene não é facilmente detectado nesta espécie, e nos traz um

alerta para o nosso estudo onde o *rmtC* foi o segundo gene mais encontrado entre as metilases estudadas, estando presente em mais da metade dos isolados.

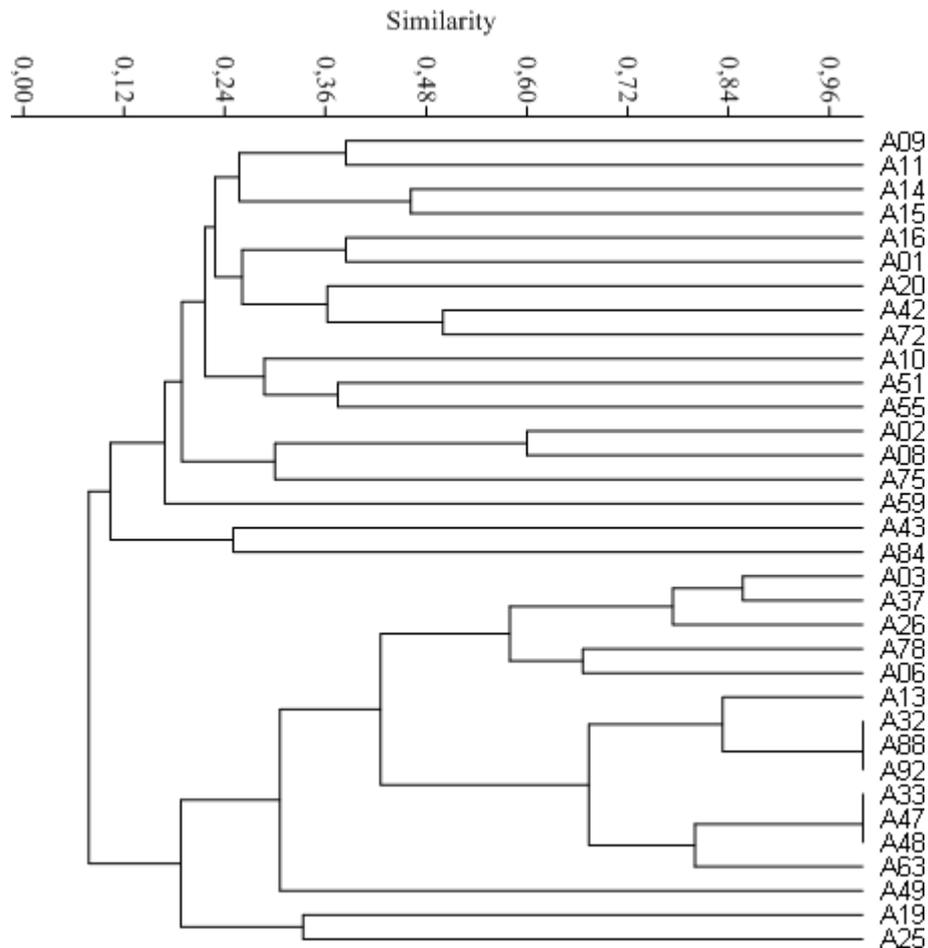
Em 2020, Pereira et al publicou o primeiro relato do gene *rmtC* em *A.baumannii* no Brasil, sendo recente o aparecimento de *rmtC* nesta espécie aqui no país, como também detectou o gene *armA* em todos os seus isolados, onde mostra-se uma circulação local dos genes *armA* e *rmtC* em isolados de *A.baumannii* em Recife. No estudo de Pereira (2020) também não foi detectado o gene *rmtD*, e diferiu em relação a detecção do gene *rmtB*. Os genes *rmtF*, *rmtG* e EMAs não foram pesquisados.

5.3. TIPAGEM MOLECULAR DO *ACINETOBACTER SPP.*

A análise da ERIC-PCR dos isolados de *Acinetobacter spp.* apresentou ampla variabilidade genética e demonstrou a presença de dois clones no hospital, C1 e C2. O clone denominado C1 foi composto pelos isolados A32, A88 e A92, no qual apresentaram 100% de similaridade genética. E os isolados A33, A47 e A48 também apresentaram 100% de similaridade genética, sendo denominado C2 (Figura 11).

O perfil clonal C1 foi encontrado em isolados clínicos de pacientes internos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e coronariana (UCO1), e o perfil C2 em pacientes internos na UTI, Clínica Cirúrgica e UCO1, sugerindo que houve disseminação do clone C1 e C2 entre as unidades hospitalares. A região de coleta dos isolados clínicos pertencentes ao clone C1 foram secreção traqueal e sangue, e as do clone C2 foram sangue, secreção biliar e secreção traqueal. A Tabela 4 mostra a distribuição dos genes de EMAs e metilases simultaneamente, perfil de ERIC-PCR, e seus respectivos fenótipos de suscetibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina.

Figura 10 - Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* de um hospital público de Recife-PE, Brasil. O dendrograma mostra o coeficiente de similaridade das amostras e a identificação dos devidos isolados.



Por outro lado durante a atual pandemia de Covid-19 através da ERIC-PCR, foi demonstrado um surto de *A.baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) em UTI de hospital Paraná, Brasil relacionado a apenas um clone em isolados de infecção e colonização (Shinohara et al, 2021).

Estudo semelhante foi realizado por Tawfik et al (2020), onde foi analisado a diversidade genotípica dos isolados de *A.baumannii* carreando enzimas modificadoras de aminoglicosídeos mediada por plasmídeo, através da ERIC-PCR. Entretanto, os resultados demonstraram uma heterogeneidade molecular significativa que indicou que não havia disseminação clonal entre pacientes de UTI.

Em relação as linhagens bacterianas que foram analisadas pela ERIC-PCR, o padrão nos clones não necessariamente apresentou a ocorrência dos genes de resistência aos aminoglicosídeos (EMAs e metilases) semelhante a outros trabalhos de El-Badawy et al, 2019, o padrão genético não é similar entre os clones, podendo ser atribuído ao processo de transmissão horizontal genética entre a bactéria e a pressão seletiva hospitalar.

Diante disto, os dados sobre a relação de clonalidade entre os isolados de *Acinetobacter* spp demonstram sua ocorrência e diversidade no ambiente hospitalar e a necessidade de métodos de prevenção a disseminação destes clones.

Tabela 4 - Distribuição de genes de resistência de EMAs e metilases, seus respectivos fenótipos de suscetibilidade e seu perfil de ERIC-PCR.

Isolados	Setor	Tipo de amostra	GEN	AMI	Genes detectados	ERIC-PCR
A1	EGI	Sangue	R	R	-	C3
A2	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C4
A3	EGI	Sangue	R	R	<i>armA</i>	C5
A6	UCO1	Sangue	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C6
A8	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA</i>	C7
A9	UTI	Ponta de cateter	R	R	<i>armA</i>	C8
A10	UCO1	Sangue	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA</i>	C9
A11	UCO2	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C10
A13	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C11
A14	EGI	Sangue	R	R	<i>rmtC</i>	C12
A15	Cardiologia	Urina	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA</i>	C13
A16	UCO1	Secreção traqueal	R	R	<i>armA</i>	C14
A19	EGI	Sangue	R	I	<i>ant(3)-Ia, ant(2)-Ia, armA, rmtC</i>	C15
A20	UTI	Sangue	R	R	<i>ant(3)-Ia, rmtC</i>	C16
A25	UCO1	Secreção traqueal	R	R	-	C17
A26	UTI	Secreção traqueal	R	R	-	C18
A32	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia</i>	C1
A33	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C2
A37	UTI	Sangue	R	R	<i>armA</i>	C19
A42	UCO1	Sangue	R	R	<i>armA</i>	C20
A43	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C21

A47	Clínica cirúrgica	Secreção biliar	R	I	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C2
A48	UCO1	Secreção traqueal	R	I	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C2
A49	EGI	Líquido pleural	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C22
A51	UTI	Ponta de cateter	R	R	<i>armA</i>	C23
A55	UTI	Ponta de cateter	R	I	<i>ant(2)-Ia, armA, rmtC</i>	C24
A59	UTI	Secreção traqueal	R	R	-	C25
A63	UTI	Secreção traqueal	R	I	<i>ant(3)-Ia, armA</i>	C26
A72	UTI	Secreção traqueal	R	S	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C27
A75	UTI	Ponta de cateter	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C28
A78	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>armA, rmtC</i>	C29
A79	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C30
A84	Clínica vascular	Tecido	R	R	<i>ant(2)-Ia, armA, rmtC</i>	C31
A88	UTI	Secreção traqueal	R	R	<i>ant(3)-Ia, armA, rmtC</i>	C1
A92	UCO1	Sangue	R	R	-	C1

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

6 CONCLUSÕES

- Dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos estudados, as nucleotidiltransferases foram as mais prevalentes entre os isolados, onde o *ant(3')-Ia* foi o gene mais encontrado, seguido por *ant(2)-Ia*. Até então, este é o primeiro relato dos genes *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia* em isolados de *Acinetobacter spp* em Recife.
- O *armA* e o *rmtC* foram as metilases encontradas neste estudo, visto que o *armA* é um gene amplamente difundido mundialmente e comumente encontrado em isolados de *Acinetobacter spp*. Entretanto, o *rmtC* tem poucos relatos nesta espécie.
- A análise da ERIC-PCR dos isolados de *Acinetobacter spp*. demonstrou a presença de dois clones no hospital, C1 e C2, sendo encontrado em pacientes internos na UTI, Clínica Cirúrgica e UCO1, sugerindo que houve disseminação do clone C1 e C2 entre as unidades hospitalares. Como também demonstrou uma grande variabilidade genética entre as cepas estudadas.

REFERÊNCIAS

- AGHAZADEH, M et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa isolates. *Microb Drug Resist.* 19(4):282-288, 2013.
- ALMASAUDI, S. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci.* 25(3): 586–596, 2018.
- ANTUNES, L; VISCA, P; TOWNER, K, J. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease.* 71, 292-301, 2014.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA NO 01/2019.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017.
- ATASOY, A, R et al. Modifying enzymes related aminoglycoside: analyses of resistant Acinetobacter isolates. *Int J Clin Exp Med.* 8(2): 2874–2880. 2015.
- BADO, I et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First rmtC Gene in the Species. *Microb Drug Resist.* 2018.
- BALLABEN, A, S et al. Diversity of High-Level Aminoglycoside Resistance Mechanisms among Gram-Negative Nosocomial Pathogens in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018.
- BECKER, B; COOPER, M, A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chem. Biol.* 8, 1, 105-115. 2013.
- 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, p. 442-445, 2011.
- BUENO, M, F, C et al. 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*, v. 57, n. 5, p. 2397-400, 2013.
- Da Paz Pereira, J.N., de Andrade, C.A.d.N., da Costa Lima, J.L. et al. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* 77, 32–39, 2020.
- DOI, Y et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in Serratia marcescens conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol 48, pag 491-496, 2004.
- DOI, Y et al. Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo--Lactamase SPM-1 in a Panresistant Pseudomonas aeruginosa Isolate from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* Vol 51, p. 852–856, 2007.

- DOI, Y; WACHINO, J; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 30(2):523-537. 2016.
- DOUGHARI, H, J et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26(2):101-12, 2011.
- 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.
- EL-BADAWY, F et al. Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia. *Infection and Drug Resistance.* 2019.
- ELJAALY, K et al. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs.* 2019.
- FAVROT, L et al. Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry.* 55(7): 989–1002. 2016.
- FILGONA, J; BANERJEE, T; ANUPURBA, S. Incidence of the novel rmtF and rmtG methyltransferases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from a hospital in India. *Infect Dev Ctries.* 9(9):1036-1039, 2015.
- FIRMO, E, F et al. Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* V.21, pages 255-261, 2020.
- FIRMO, E, F et al. Emergence of aph(3')-VI and accumulation of aminoglycoside modifying enzyme genes in KPC-2-possessing *Enterobacter aerogenes* isolates from infections and colonization in patients from Recife-PE, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol.52, 2019.
- FRANCISCO, G, R et al. Identification of Aminoglycoside-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing RmtG 16S rRNA Methyltransferase in a Cystic Fibrosis Patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015.
- FOSSO, M, Y; LI, Y; GARNEAU-TSODIKOVA, S. New trends in aminoglycosides use. *Medchemcomm.* 5(8): 1075–1091. 2014.
- GALIMAND, M et al. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47, 2565–2571. 2003.
- GRUTA, V et al. Trends in resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* species in hospitalized patients in the United States: 2013–2017. *BMC Infect Dis.* 19:742, 2019.
- HARDING, C, M; HENNON, S, W; FELDMAN, M, F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018.

- HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 7, p. 1543–1550, 1 jul. 2013.
- HYUN OH, D et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in lung transplant recipients: risk factors and prognosis. *Infectious Diseases*, Vol. 51, N. 7, 493–501, 2019.
- HU, F et al. Klebsiella pneumoniae Sequence Type 11 Isolate Producing RmtG 16S rRNA Methyltransferase from a Patient in Miami, Florida. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V.58, pag 4980–4981, 2014.
- JEAN, S et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia. *Journal of Clinical Medicine*. 2020.
- JOSPE-KAUFMAN, M; SIOMIN, L; FRIDMAN, M. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020.
- KOULENTI, D; TSIGOU, E; RELLO, J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016.
- KRAUSE, K, M et al. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016.
- LABBY, K, J; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. *Future Med Chem*. 2013.
- LATORRE, M et al. 6-O-Nucleotidyltransferase: an aminoglycosidemodifying enzyme specific for streptomycin/streptidine. *Med. Chem. Commun.* 7, 177. 2016.
- LEE, C et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 7: 55, 2017.
- LIN, T et al. Identification of aac(2)-I Type b aminoglycoside-modifying enzyme genes in resistant *Acinetobacter baumannii*. *Genet. Mol. Res.* 14 (1): 1828-1835. 2015.
- LIU, Z; LING, B; ZHOU, L. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother.* 2015.
- MANCINI, S et al. Klebsiella pneumoniae co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 90(2): 151-152, 2018.
- MARTINS, E, V et al. Genome and plasmid context of two rmtG-carrying *Enterobacter hormaechei* isolated from urinary tract infections in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v.30, 36-40, 2019.
- MATARUCO, Mayra Miotto. Perfil de suscetibilidade, genes de resistência aos aminoglicosídeos e similaridade genética em amostras de *Acinetobacter baumannii*

isoladas em um Hospital Terciário. 2015. 84 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/127898>>.

MIRO, E et al. Characterization of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Enterobacteriaceae Clinical Strains and Characterization of the Plasmids Implicated in Their Diffusion. *Microbial drug resistance*. Vol 19, N 2, 2013.

MOUBARECK, C, A; HALAT, D, H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 9(3): 119, 2020.

PASSARELLI-ARAÚJO, H et al. Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil: RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). *An Acad Bras Cienc*. 2019.

POLOTTO, M et al. Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. V.53, 2019.

POIREL, L et al. Emergence of the 16S rRNA Methylase RmtG in an ExtendedSpectrum-Lactamase-Producing and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolate in Chile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V.58, pag 618–619, 2014.

RAHMAN, M et al. RmtC and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in NDM-1–Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis*. 21(11): 2059–2062, 2015.

RAMIREZ, M, S; TOLMASKY, M, E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010.

RUPPE, E et al. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 5: 21. 2015.

SALIMIZAND, H et al. Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of *aadA1* and *armA*. *Infect Genet Evol*. 2018.

SARDA, C; FAZAL, F; RELLO, J. Management of ventilator-associated pneumonia (VAP) caused by resistant gram-negative bacteria: which is the best strategy to treat? *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2019.

SANTOS, M, D, V et al. Genetic and Biochemical Diversity of Clinical *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Public Hospital in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2020.

SATO, Y et al. Virulence Characteristics of *Acinetobacter Baumannii* Clinical Isolates Vary with the Expression Levels of Omps. *J. Med. Microbiol*. V. 66, 203–212, 2017.

SERIO, A, W et al. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*, 66:195-199. 2018.

SHINOHARA R et al. Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)-specific intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2021.

SILVA, J, G; CARVALHO, I. New Insights into Aminoglycoside Antibiotics and Derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1101-1119, 2007.

SKARIYACHAN, S. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Critical Reviews in Microbiology*. 2019.

SHIN, B; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. *Journal of Microbiology*. Vol. 55, No. 11, pp. 837-849, 2017.

SMANI, Y et al. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. V. 58, 1806-1808, 2014.

SMITH, C, A et al. Structural basis for the diversity of the mechanism of nucleotide hydrolysis by the aminoglycoside-2"-phosphotransferases. *Acta Cryst*. D75, 1129-1137. 2019.

TAWFICK M et al. Dissemination of Plasmid Mediated Aminoglycoside-Modifying Enzymes Among MDR *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Tertiary Care Egyptian Hospital. *The Open Microbiology Journal*. 14, 98-106. 2020.

UD-DIN, A, I, M, S et al. Structure and Functional Diversity of GCN5-Related N-Acetyltransferases (GNAT). *Int J Mol Sci*. 17(7): 1018. 2016.

VRANCIANU, C, O et al. Antibiotic Resistance Profiles, Molecular Mechanisms and Innovative Treatment Strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2020.

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

WACHINO, J et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol 50, pag 178-184, 2006.

WACHINO, J et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol 51, pag 4401-4409, 2007.

WACHINO, J; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resist Updat*. 15 (3): 133-48. 2012.

WACHINO, J; DOI, Y; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin*. 2020.

APÊNDICE A – ARTIGO EM PORTUGUÊS PARA SUBMISSÃO**Revista:** ABCS Health Sciences**Investigação de genes de resistência a aminoglicosídeos em isolados clínicos de
Acinetobacter spp. em um hospital de Recife -PE****Investigation of aminoglycoside resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter*
spp. in a hospital in Recife -PE**

Aline Mirely Sousa Albuquerque¹, Jailton Lobo da Costa Lima² José Luciano Brainer de
Farias Filho² Adriana Maria Costa Marques da Silva²; Maria Amélia Vieira Maciel²

¹ Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes
Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil;
(83)991556895, alinemr192@gmail.com

² Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes
Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

Introdução: *Acinetobacter spp.* são patógenos oportunistas que conseguem desenvolver resistência aos aminoglicosídeos através da degradação enzimática pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e metilases 16S RNAr. **Objetivo:** O presente estudo avaliou o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e investigou a ocorrência de AMEs e dos genes metilases em isolados hospitalares de *Acinetobacter spp.*, provenientes de um hospital de Recife-PE e a relação clonal entre os isolados. **Métodos:** Foram investigadas as AMEs (*aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia*) e metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*) em 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes a um ou mais aminoglicosídeos, provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE e foi realizada ERIC-PCR para determinação da relação clonal. **Resultados:** Dos três genes de AMEs estudados, o *ant(3'')-Ia* foi o gene mais prevalente presente em 43% (15/35) dos isolados, seguido por *ant(2'')-Ia* com menos de 1% (3/35), e o gene *aac(6')-Ib* não foi detectado. Entre as metilases, o *armA* e o *rmtC* foram os mais encontrados, com 80% (28/35) e 57% (20/35), respectivamente. Os genes *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* não foram detectados. A tipagem molecular por ERIC-PCR demonstrou a disseminação de dois clones no hospital. **Conclusões:** Os aminoglicosídeos, diferentemente dos demais inibidores de síntese proteica, são bactericidas e são utilizados em bactérias multirresistentes (MDR) combinado com outros antimicrobianos. A presença de múltiplos genes de resistência a esta classe limita as opções de tratamento e favorece uma maior disseminação de patógenos MDR.

Palavras-chave: *Acinetobacter spp.*, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, metilases.

ABSTRACT

Introduction: *Acinetobacter spp.* are opportunistic pathogens that can develop resistance to aminoglycosides through enzymatic degradation by aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) and 16S rRNA methylases. **Objective:** The present study evaluated the profile of susceptibility to aminoglycosides and investigated the occurrence of AMEs and methylases genes in clinical isolates of *Acinetobacter spp* from a hospital in Recife-PE and a clonal relationship between those needed. **Methods:** AMEs (aac (6') - Ib, ant (2") - Ia and ant (3") - Ia) and 16S rRNA methylases (armA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtF, rmtG) were investigated in 35 isolates from *Acinetobacter spp.* resistant to one or more aminoglycosides, from patients at a tertiary hospital in Recife-PE, and ERIC-PCR was performed to determine the clonal relationship. **Results:** Of the three AMEs genes studied, ant(3')-Ia was the most prevalent gene present in 43% (15/35) of those granted, followed by ant(2)-Ia (3/35), and the gene aac(6')-Ib was not detected. Among the methylases, armA and rmtC were the most common, with 80% (28/35) and 57% (20/35), respectively. The rmB, rmtD, rmtF and rmtG genes were not detected. Molecular typing by ERIC-PCR applies the dissemination of two clones in the hospital. **Conclusions:** Aminoglycosides, unlike other synthetic protein inhibitors, are bactericidal and are used in multiresistant bacteria (MDR) combined with other antimicrobials. The presence of multiple resistance genes to this class is limited as treatment options and favors the greater spread of MDR pathogens.

Keywords: *Acinetobacter spp*; Aminoglycoside modifying enzymes; RNARr 16S methylases.

INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. são patógenos associados a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), incluindo pneumonia, sepses, infecções de pele e tecidos moles, trato urinário e infecções de feridas. A espécie mais comumente associada a essas infecções é o *A. baumannii*. A infecção por este micro-organismo geralmente ocorre em pacientes que fazem uso de ventilação mecânica, em feridas cirúrgicas, traumas graves, queimaduras, e os fatores que contribuem para sua aquisição são a internação prévia, tempo de internação prolongada, uso de cateteres e uso prévio de antibióticos ¹.

No tratamento de *A.baumannii*, utiliza-se classes de antimicrobianos como carbapenêmicos, polimixina e tigeciclina, mas as estratégias de tratamento atuais estão limitadas devido a propensão a desenvolver resistência. Devido a isto, optam-se por utilizar uma terapia combinada, incluindo dois ou três diferentes classes de antimicrobianos, onde assim obtém-se um amplo espectro de cobertura e um efeito sinérgico contra o patógeno ². Os aminoglicosídeos são antimicrobianos utilizados na terapêutica antimicrobiana em infecções causadas por bacilos aeróbicos gram-negativos, como *A.baumannii* ³. São fármacos de amplo espectro, disponível em diferentes formulações, utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, respiratório, sepse, pneumonia e infecções de pele ⁴.

Acinetobacter spp. vem adquirindo resistência aos antimicrobianos rapidamente, através de vários mecanismos como degradação enzimática de antimicrobianos, modificação de sítio alvos, bombas de efluxo e alterações da permeabilidade. A degradação enzimática aos aminoglicosídeos ocorre através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e metilases de 16S RNAr ⁵.

A inativação enzimática é a forma de resistência mais comum aos aminoglicosídeos. As AMEs atuam catalisando uma modificação nos grupos químicos --OH ou -NH₂ do núcleo da 2-desoxitreptamina ou porções açúcares dos fármacos aminoglicosídeos, impedindo que o fármaco se ligue às subunidades dos ribossomos, estas podem ser classificadas em três classes: acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT) ⁶. Por outro lado, as metilases 16S RNAr acarretam resistência aos aminoglicosídeos através da modificação de resíduos específicos de nucleotídeos de RNAr, bloqueando os aminoglicosídeos de se ligar ao seu alvo. Elas atuam por meio da metilação de um nucleotídeo no sítio de ligação do aminoglicosídeo do rRNA 16S ⁷.

Acinetobacter spp. codificam uma diversidade de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Liu et al ⁸ ao analisar 60 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes à amicacina, observou que apenas o *armA* do gene metilase 16S RNAr foi prevalente (66,7 %), enquanto outras metilases 16S RNAr como *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtE* e *npmA* não foram detectados. As prevalências dos genes de enzimas modificadoras *aac* (6')-Ib , *ant*-(3'') - Ia e *aph* (3') - I foram as mais prevalentes entre as AMEs.

No Brasil, um estudo analisou a presença de genes metilases 16S RNAr (*rmtD* e *rmtG*) e AMEs (*aacA4* , *aacA1* , *aacC1* , *aphA6* , *aphA7* , *aph* (3') - IIb , *aadB* , *aadA1* , *addA2* , *aadA6*, *aadA7* , *strA* e *strB*) em isolados de bactérias gram-negativas, incluindo não fermentadores como *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* em três estados no período de 2007 a 2014, descrevendo nos isolados de *A. baumannii* apenas genes AMEs, como *aacA4* , *aacC1* , *aphA7* , *aadB* , *aadA1* , *aphA6*, e não detectou *rmtD* ou *rmtG*. O *rmtD* foi detectado apenas em *P. aeruginosa*, e *rmtG* em *Klebsiella pneumoniae* ⁹.

Em relação as metilases, o primeiro relato de *rmtC* em *A. baumannii* foi publicado por Bado e colaboradores ¹⁰, em dois isolados provenientes de uma Unidade de Terapia

Intensiva de um Hospital Universitário do Uruguai. Posteriormente, no estado de Pernambuco, Brasil, Da Paz Pereira et al ¹¹ avaliou isolados provenientes de um hospital oncológico, onde foram detectados a presença dos genes metilases 16S RNAr: *armA*, *rmtB* e *rmtC*, sendo este estudo o primeiro relato do gene *rmtC* em isolados de *A. baumannii* no Brasil.

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

MÉTODOS

Tipo de estudo

Estudo descritivo de base laboratorial, que avaliou o perfil de suscetibilidade aos aminoglicosídeos e investigou a presença de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: acetiltransferases *aac(6')-Ib* e nucleotidiltransferases *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia*; e a presença dos genes metilases 16S RNAr: *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG* em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.*

Isolados bacterianos

Foram selecionados 35 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes a um ou mais aminoglicosídeos (gentamicina e ampicilina), provenientes de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, coletados em 2018. Os isolados foram mantidos congelados em estoque com glicerol a -20°C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular. Para as análises, as bactérias foram reativadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) incubadas

por 48 horas em estufa a 37°C, semeadas em meio Luria Bertani (LB) e colocadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os isolados bacterianos analisados neste trabalho foram provenientes de projeto que foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde número CAAE 0490.0.172.000-11.

Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo LB a 37°C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total dos isolados clínicos. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm.

PCR dos genes que codificam as AMES

Os genes *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia* foram investigados pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na **Tabela 1**. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 2µl de DNA genômico a 10 ng/µl, 8 mM de dNTP (0,6 µL), 5x tampão (5 µL), 25 mM de MgCl₂ (2,0 µL) e 5 U de Taq DNA polimerase (0,2 µL) e 2 µL de cada primer a 10pmol. Foi adicionado um controle negativo em cada reação, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA; e um controle positivo no gene *aac(6')-Ib* que foi cedido por Elza Ferreira Firmo, e os resultados do *ant(2'')-Ia* e *ant(3'')-Ia* que não continha controle positivo, foram confirmados por sequenciamento. As amplificações foram realizadas no termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, com cada ciclo de 30 segundos à 94°C para desnaturação, anelamento por 30 segundos à 55°C para o *ant(2'')-Ia*, 49°C para o *ant(3'')*-

Ia e 45°C para *aac(6')-Ib* e 1 minuto à 72°C para alongamento. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5x. Posteriormente foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

PCR dos genes que codificam metilases

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

Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG

AGCG-3']), Tampão 1x, 200 μ M do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com Blue-green e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais ¹².

Sequenciamento genético

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

RESULTADOS

Os 35 isolados de *Acinetobacter spp.* foram obtidos de diferentes amostras clínicas, sendo os provenientes de secreção traqueal e sangue com maior frequência, correspondendo a 48,6% e 28,6%, respectivamente. Em seguida, as amostras clínicas menos frequentes foram pontas de cateter (11,4%), urina, secreção biliar, líquido pleural

e fragmento de tecido (2,8%) cada. A maioria dos isolados foram obtidos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), representando a 54,3% do total, seguidos por Unidade Coronariana (UCO1) com 20%, Emergência Geral (EGI) com 14,3%; e UCO2, Cardiologia, Clínica cirúrgica e Clínica Vasculard com 2,8% cada.

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

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

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

A análise da ERIC-PCR dos isolados de *Acinetobacter spp.* demonstrou a presença de dois clones no hospital, C1 e C2. O clone denominado C1 foi composto pelos isolados A32, A88 e A92, no qual apresentaram 100% de similaridade genética. E os isolados A33, A47 e A48 também apresentaram 100% de similaridade genética, sendo

denominado C2. O perfil clonal C1 foi encontrado em isolados clínicos de pacientes internos na UTI e UCO1, e o perfil C2 em pacientes internados na UTI, Clínica Cirúrgica e UCO1. A região de coleta dos isolados clínicos pertencentes ao clone C1 foram secreção traqueal e sangue, e as do clone C2 foram sangue, secreção biliar e secreção traqueal (Figura 1).

DISCUSSÃO

A frequência da resistência dos isolados bacterianos no presente trabalho aos aminoglicosídeos foi 100% à gentamicina e em relação à amicacina de 83%, frequências menores da resistência a estes fármacos foram descritas por Castilho et al ¹³, de 57,1% à gentamicina e 21,4% à amicacina em Goiânia, Brasil. Por outro lado, índices de 76% e 32% respectivamente à gentamicina e amicacina foram descritos em São José Rio Petro, São Paulo, Brasil ¹⁴. Dados descritos no Amazonas ¹⁵ descrevem dados semelhantes ao presente trabalho em relação à gentamicina, mas também uma frequência de 100% de resistência para amicacina, dados semelhantes aos nossos foram descritos por Jouybari et al ¹⁶, no Iran.

Semelhante a este estudo, um estudo realizado no Irã ¹⁷ analisou a distribuição de AMEs e metilases 16S RNAr em *A. baumannii* e *Acinetobacter nosocomialis*, onde foram detectados predominantemente o *armA*, representando 41,6% em *A. baumannii* e 67,4% em *A. nosocomialis*; e não foram detectados *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*; diferindo deste estudo em relação ao *rmtC*, onde foi constatado uma prevalência deste gene. Em relação as AMEs, o *ant(3)-Ia* também foi o gene mais frequente, representando 74,1% em *A. baumannii* e 86% em *A. nosocomialis*.

Em 2018, Bado et al ¹⁰ publicou o primeiro relato do gene *rmtC* em *A. baumannii* no Uruguai, identificado em uma Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário. Posteriormente em 2020, Da Paz Pereira ¹¹ publicou o primeiro relato do gene *rmtC* em

A.baumannii no Brasil proveniente de um hospital oncológico de Recife-PE, sendo recente o aparecimento de *rmtC* nesta espécie aqui no país, como também detectou o gene *armA* em todos os seus isolados.

Na China ⁸ também foram detectados alta prevalência do gene *armA* entre isolados de *A. baumannii*, totalizando 66,7% dos isolados, porém não obteve nenhum isolado com a presença do gene *rmtC*, como também os genes *rmtB* e *rmtD* não foram detectados. Entre os genes das AMEs, teve maior prevalência os genes *aac (6')-Ib* (51,7%) e *ant (3'')-Ia* (81,7%), diferindo deste estudo, onde o gene *aac (6')-Ib* não foi detectado em nenhum dos isolados.

Poucos são os relatos dos genes *ant(2')-Ia* ou *ant(3')-Ia* em isolados de *Acinetobacter spp.* no Brasil. Ballaben et al ⁹ ao avaliar a resistência a aminoglicosídeos de alto nível em bacilos gram-negativos não fermentadores, detectou em um isolado de *A. baumannii* a presença dos genes *ant(2')-Ia* e *ant(3')-Ia* juntamente com outras AMEs. Entretanto, Polotto ¹⁴ ao pesquisar AMEs em isolados de *A. baumannii* provenientes de um hospital público de São José de Rio Preto, não detectou o gene *ant(2'')-Ia*, porém o *aac(6')-Ib* foi o segundo gene mais prevalente e o *ant(3')-Ia* não foi pesquisado.

Os dados genéticos da ERIC-PCR neste presente estudo descreveram a ocorrência de dois clones que estavam presentes de pacientes internados na UTI, UCO1 e Clínica cirúrgica, este padrão clonal foi similar aos dados de Ece et al ¹⁸. Resultados similares também foram detectado por Araújo Lima et al ¹⁹, ao analisar isolados de *A.baumannii* provenientes de dois hospitais públicos de Recife-PE, onde a ERIC-PCR revelou 5 clones, indicando dispersão clonal entre setores diferentes do mesmo hospital.

Por outro lado, durante a atual pandemia de Covid-19 através da ERIC-PCR, foi demonstrado um surto de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos em UTI de um hospital no Paraná, Brasil relacionado a apenas um clone em isolados de infecção e

colonização ²⁰. Estudo semelhante foi realizado por Tawfick et al ²¹, onde foi analisado a diversidade genotípica dos isolados de *A. baumannii* carreando enzimas modificadoras de aminoglicosídeos mediada por plasmídeo, através da ERIC-PCR. Entretanto, os resultados demonstraram uma heterogeneidade molecular significativa que indicou que não havia disseminação clonal entre pacientes de UTI.

Em relação as linhagens bacterianas que foram analisadas pela ERIC-PCR, o padrão nos clones não necessariamente apresentou a ocorrência dos genes de resistência aos aminoglicosídeos (AMEs e metilases) semelhante a outros trabalhos de El-Badawy et al ²², o padrão genético não é similar entre os clones, podendo ser atribuído ao processo de transmissão horizontal genética entre a bactéria e a pressão seletiva hospitalar. Diante disto, os dados sobre a relação de clonalidade entre os isolados de *Acinetobacter* spp demonstram sua ocorrência e diversidade no ambiente hospitalar e a necessidade de métodos de prevenção a disseminação destes clones.

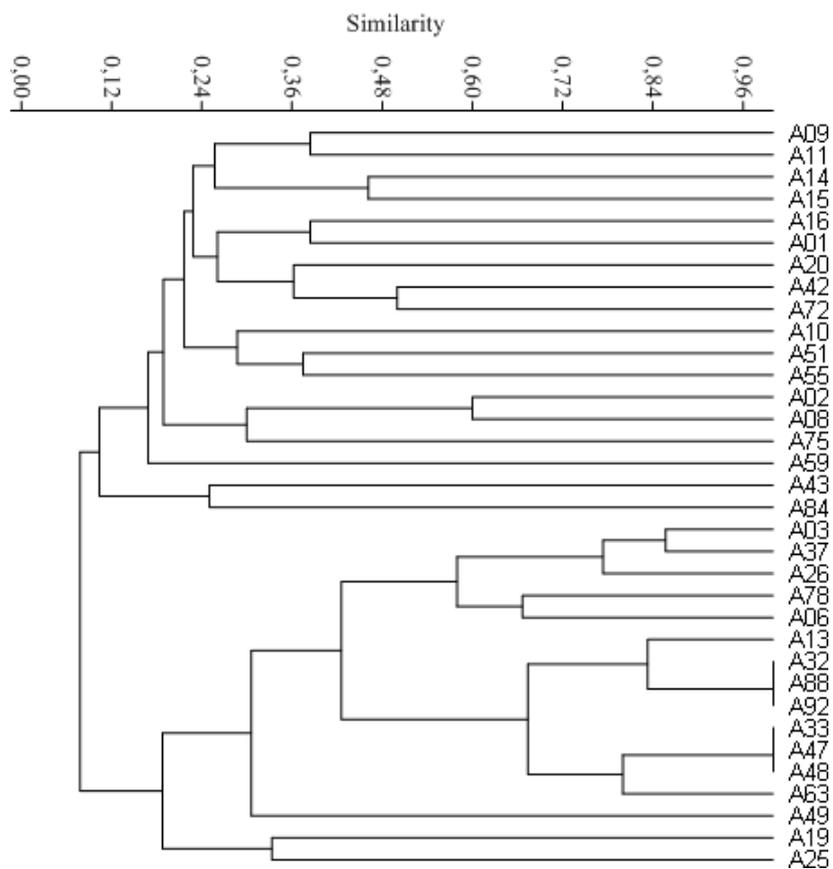
Tabela 1: Primers utilizados para a pesquisa dos genes codificadores das AMEs e metilases.

Genes	Sequência do primer	Fragmento (pb)	Referências
aac(6')-Ib	5'-CAAAGTTAGGCATCACA-3' 5'-ACCTGTACAGGATGGAC-3'	540	23
ant(2')-Ia	5'-ACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGT-3' 5'-CTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG-3'	572	23
ant(3')-Ia	5'-TCGACTCAACTATCAGAGG-3' 5'-ACAATCGTGACTTCTACAGCG-3'	245	23
armA	5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3' 5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3'	101	24
rmtB	5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3' 5'-AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3'	171	24
rmtC	5'-CAGGGGTTCCAACAAGT-3' 5'- AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3'	246	24
rmtD	5'-GGAAAAGGACGTGGACA-3' 5'-TCCATCGATTCCACAGG-3'	171	24
rmtF	5'-GCGATACAGAAAACCGAAGG-3' 5'-ACCAGTCGGCATAGTGCTTT-3'	589	25
rmtG	5'-AAATACAGCGATGTGTGTCC-3' 5'-ACACGGCATCTGTTTCTTCC-3'	250	26

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

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

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



REFERÊNCIAS

1. Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci. 2018;25(3):586-596. doi:10.1016/j.sjbs.2016.02.009.
2. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front Cell Infect Microbiol. 2017, 13;7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
3. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. EcoSal Plus. 2018;8(1). doi: 10.1128/ecosalplus.
4. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(6):a027029. doi:10.1101/cshperspect.a027029.
5. Shin B, Park W. Antibiotic resistance of pathogenic Acinetobacter species and emerging combination therapy. J Microbiol. 2017;55(11):837-849. doi:10.1007/s12275-017-7288-4.
6. Labby KJ, Garneau-Tsodikova S. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. Future Med Chem. 2013;5(11):1285-1309. doi:10.4155/fmc.13.80.
7. Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):523-537. doi:10.1016/j.idc.2016.02.011.

8. Liu Z, Ling B, Zhou L. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother*. 2015;27(4):207-212. doi:10.1179/1973947814Y.0000000190.
9. Ballaben AS, Andrade LN, Galetti R, Ferreira JC, McElheny CL, Mettus RT, et al. Diversity of High-Level Aminoglycoside Resistance Mechanisms among Gram-Negative Nosocomial Pathogens in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(11):e01550-18. Published 2018 Oct 24. doi:10.1128/AAC.01550-18.
10. Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First *rmtC* Gene in the Species. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):1012-1019. doi:10.1089/mdr.2017.0300.
11. da Paz Pereira JN, de Andrade CADN, da Costa Lima JL, de Lima Neto RG, de Araújo PSR, Maciel MAV. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. *Curr Microbiol*. 2020;77(1):32-39. doi:10.1007/s00284-019-01786-6.
12. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res*. 2009;109(5):511-517. doi:10.1016/j.envres.2009.02.014
13. Castilho SRA, Godoy CSM, Guilarde AO, Cardoso JL, Andre MCP, Junqueira-Kipnis P et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS ONE*. 2017.12(5):e0176790.
14. Polotto M, Casella T, Tolentino FM, Mataruco MM, Porto NKM, Binhardi MFB, et al. Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of

Acinetobacter baumannii isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20190044. doi:10.1590/0037-8682-0094-2019.

15. Ribeiro EA, Gales AC, Oliveira APS, Coelho DD, Oliveira RA, Pfrimer IAH et al. Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in the Brazilian Amazon region. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.* 2021. Vol 54.

16. Jouybari, MA, Mohammad A, Mirzaei B, Goli HR. Role of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylase (ArmA) in resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates against aminoglycosides. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.* 2021. Vol 54.

17. Salimizand H, Zomorodi AR, Mansury D, Khakshoor M, Azizi O, Khodaparast S, et al. Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of *aadA1* and *armA*. *Infect Genet Evol.* 2018; 66:195-199. doi:10.1016/j.meegid.2018.09.028.

18. Ece G, Erac B, Cetin HY, Ece C, Baysak A. Antimicrobial Susceptibility and Clonal Relation Between *Acinetobacter baumannii* Strains at a Tertiary Care Center in Turkey. *Jundishapur J Microbiol.* 2015. 8(2): e15612.

19. Araújo Lima AV, da Silva SM, do Nascimento Júnior JAA, Correia MDS, Luz AC, Leal-Balbino TC, et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.* 2020. Jul;26(7):802-814. doi: 10.1089/mdr.2019.0214.

20. Shinohara DR, Saalfeld SMS, Martinez HV, Altafini DD, Costa BB, Fedrigo NH et al. Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)–specific intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2021.
21. Tawfick MM, Rady HF, El-Borhamy MI, Maraqa, AD. Dissemination of Plasmid Mediated Aminoglycoside-Modifying Enzymes Among MDR *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Tertiary Care Egyptian Hospital. *The Open Microbiology Journal*. 2020. 14, 98-106. DOI: 10.2174/1874285802014010098.
22. El-Badawy MF, Abdelwahab SF, Alghamdi SA, Shohayeb MS. Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia. *Infection and Drug Resistance*. 2019.
23. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist*. 2013;19(2):94-99. doi:10.1089/mdr.2012.0125.
24. 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(4):442-445. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.016.
25. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(7):1543-1550. doi:10.1093/jac/dkt078.

26. 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(5):2397-2400. doi:10.1128/AAC.02108-12.