

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Curso de Biomedicina

Estágio em Pesquisa e Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Pesquisa dos genes estruturais, *adeB* e *adeC*, e regulatórios, *adeR* e *adeS*, do sistema de bomba de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp.**

Thaís dos Santos Hain

Porto Alegre

Julho/2013

Thaís dos Santos Hain

**Pesquisa dos genes estruturais, *adeB* e *adeC*, e regulatórios, *adeR* e *adeS*, do sistema de bomba de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gertrudes Corção

Porto Alegre

Julho/2013

## ÍNDICE

1. Abreviaturas	4
2. Introdução expandida	5
3. Artigo	10
3.1. Resumo	10
3.2. Introdução	11
3.3. Materiais e métodos	12
3.4. Resultados	15
3.5. Discussão	18
3.6. Referências	20
4. Conclusão e perspectivas	23

## 1. ABREVIATURAS

Ami	amicacina
Caz	ceftazidima
CCCP	carboxilciadina m-clorofenilhidrazona
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
Imp	imipenem
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MIC	<i>Minimal Inibitory Concentration</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
µg	micrograma
µL	microlitro

## 2. INTRODUÇÃO EXPANDIDA

*Acinetobacter* é um gênero de cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores, pleomórficos, não móveis e aeróbios restritos [Peleg et al. 2008], que compreende pelo menos 36 espécies diferentes [Peleg et al. 2012]. Está amplamente distribuído na natureza, em vários tipos de solo, água e alimentos. É comumente encontrado na pele e, eventualmente, pode colonizar o trato respiratório superior, sendo assim considerado um micro-organismo não patogênico em pessoas saudáveis [Dickshoorn et al. 2007]. No entanto, nas últimas décadas, algumas espécies de *Acinetobacter* têm se apresentado como patógenos oportunistas, responsáveis por um grande número de infecções nosocomiais [Magnet et al. 2001], que tem como alvo principal pacientes com tempo de hospitalização prolongado, severamente doentes e com baixa imunidade [Howard et al. 2012].

As infecções por *Acinetobacter* podem acontecer de forma esporádica ou em surtos, acometendo principalmente o sistema respiratório e o trato urinário [Huang et al. 2008]. A pneumonia associada à ventilação mecânica é uma manifestação muito frequente [Peleg et al. 2008], além de infecções de pele, tecidos moles, feridas e traumas, sistema nervoso central e septicemia [Huang et al. 2008; Coyne et al. 2011]; mais raramente podem ocorrer também endocardite e endoftalmite [O'Shea 2012]. As espécies de maior importância clínica são *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* (anteriormente chamado genoespécie 3) e *Acinetobacter nosocomialis* (anteriormente chamado genoespécie 13TU) [Nemec et al. 2011], reconhecidos como responsáveis pela maioria dos casos de infecção, tanto na comunidade quanto em ambiente hospitalar [O'Shea 2012]. Esse grupo de espécies é chamado atualmente de complexo *A. baumannii* [Peleg et al. 2008].

Algumas características chamam a atenção da comunidade médico-científica para *Acinetobacter* spp., uma delas é sua capacidade de sobreviver e crescer em diversas condições, inclusive em superfícies secas. Isto contribui para sua disseminação em praticamente qualquer lugar, mesmo em ambiente hospitalar [Abbo et al. 2005], onde pode encontrar pacientes vulneráveis e ser transmitido pelo contato entre as pessoas ou transportado pelo ar [Dijkshoorn et al. 2007]. Outra característica, que pode ser a de maior importância clínica, é o fato de *Acinetobacter* spp. apresentar resistência intrínseca a diversas classes de agentes antimicrobianos [Coyne et al. 2011], sendo esta a maior dificuldade no controle e no tratamento das infecções, uma vez que o tratamento de primeira escolha nem sempre funciona. Como agravante, tem sido descrito que *Acinetobacter* possui grande

habilidade em adquirir diversos mecanismos de resistência [Vila et al. 2007], o que faz desse micro-organismo uma causa maior de grande preocupação em ambiente hospitalar, já que a assepsia dos materiais e aparelhos médicos pode não ser eficaz. Além disso, a resistência do patógeno aumenta com o uso indiscriminado de biocidas e antimicrobianos, prática esta que leva à seleção de micro-organismos multirresistentes [Kawamura-Sato et al. 2010], altamente capazes de sobreviver e infectar pacientes vulneráveis, causando infecções de difícil e caro tratamento, que são potencialmente letais [Dijkshoorn et al. 2007].

Existem diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Figura 1). Em *Acinetobacter*, os mais comuns são: alterações da permeabilidade da membrana externa, com a redução da expressão ou mutações nos genes que codificam as porinas, impedindo a entrada de antimicrobianos na célula; alteração de sítios alvo da ligação de antimicrobianos às proteínas da membrana citoplasmática; produção de enzimas, utilizadas no mecanismo de inativação enzimática das drogas, tais como  $\beta$ -lactamases e carbapenemases, e expressão de bombas de efluxo específicas [Munoz-Price e Weinstein 2008].

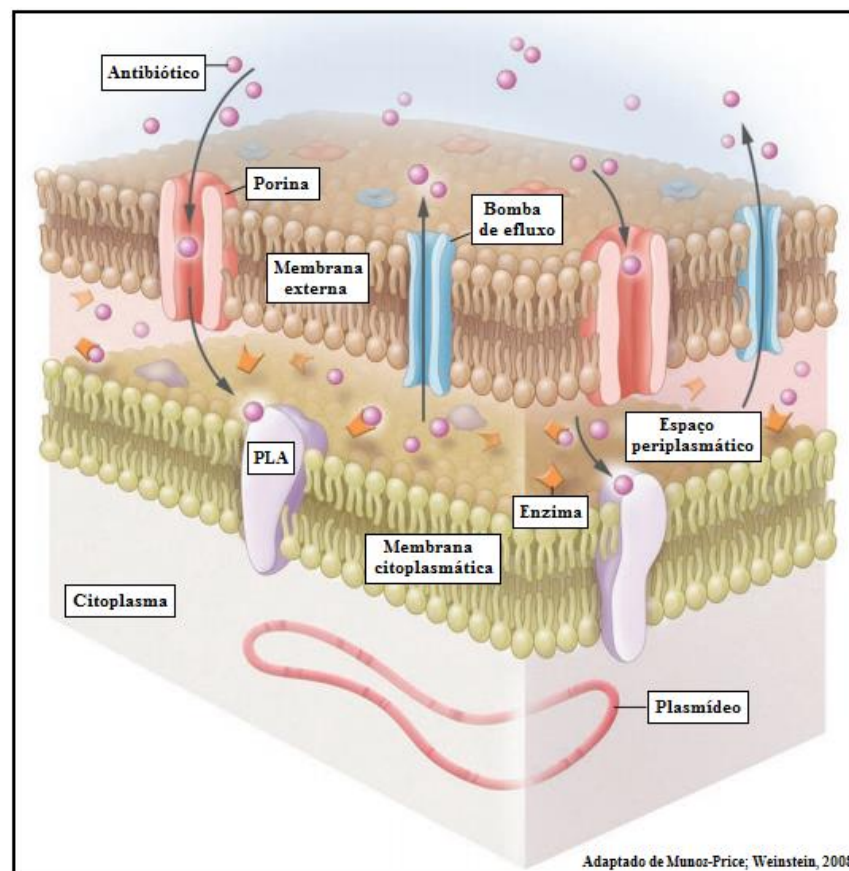


Figura 1: Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter*.

Esses mecanismos podem ser intrínsecos, uma vez que o patógeno pode apresentar ilhas de resistência, as quais possuem grupos de genes para multirresistência [Li e Nikaido 2009], ou adquiridos, quando ocorre transferência de material genético exógeno ou mutações em genes endógenos, estruturais ou regulatórios [Yoon et al. 2013].

As bombas de efluxo constituem uma classe de transportadores, responsáveis pela excreção de subprodutos metabólicos e substâncias tóxicas, captação de nutrientes e comunicação intercelular [Li e Nikaido 2004]. Diversos antimicrobianos são considerados substratos para as bombas de efluxo, agindo desta forma, podem aumentar a expressão gênica codificante para estas bombas, desenvolvendo um alto perfil de multirresistência [Magnet et al. 2001].

As bombas de efluxo são agrupadas em famílias, cada uma com um mecanismo específico. São elas: a família ABC (*ATP binding cassette*), que realiza o efluxo através da hidrólise de ATP; os transportadores MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), que estão presente em todos os organismos, utilizam força próton motiva e gradiente de íons sódio no efluxo; a superfamília SMR (*small multidrug resistance*), que é o menor sistema de efluxo, e também funciona através da força próton motiva; a superfamília dos facilitadores principais (MFS – *major facilitator superfamily*), que é o maior grupo de transportadores ativos secundários e utiliza a força próton motiva no sistema de antiporte; e a superfamília de transportadores resistência-nodulação-divisão (RND), que também funcionam por meio de um sistema de antiporte dependente da força próton motiva e são muito difundidos entre bactérias Gram-negativas [Li e Nikaido 2009; Piddock 2006a]. Em *Acinetobacter*, a resistência está associada às duas últimas, a superfamília dos facilitadores principais e a família resistência-nodulação-divisão.

O sistema de efluxo RND funciona transportando, em antiporte, prótons e drogas; por meio dele é catalisado o efluxo de diversos agentes antimicrobianos e quimioterápicos [Piddock 2006b]. Transportadores RND consistem de um componente de membrana interna pertencente à superfamília de transportadores secundários RND, um fator formador de canal de membrana externa (OMP) e uma proteína periplasmática de fusão de membranas (MFP) [Li e Nikaido 2004]. O fator OMP gera um túnel contínuo que abrange a membrana externa e o espaço periplásmico e a MFP atua aproximando as membranas interna e externa ou estabilizando a estrutura formada por OMP [Magnet et al. 2001]. A interação desses

componentes forma um sistema tripartido, que permite o transporte de substâncias através de ambas as membranas em bactérias Gram-negativas.

Estudos indicam que a membrana externa de *Acinetobacter* apresenta permeabilidade especialmente baixa, o que contribui para a eficiência do sistema de efluxo nesse organismo [Li e Nikaido 2009]. Adicionalmente, cepas multirresistentes muitas vezes apresentam determinantes genéticos mediadores de resistência a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.

A superexpressão de três sistemas RND: *AdeABC*, *AdeFGH* e *AdeIJK* (Figura 2), tem sido associada com fenótipo de multirresistência em *A. baumannii* [Yoon et al. 2013]. *AdeIJK* é responsável pela resistência intrínseca, atua no efluxo de  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, fluoroquinolonas, ácido fusídico, novobiocina e trimetoprima. *AdeFGH* confere resistência a cloranfenicol, clindamicina, trimetoprima, tetraciclina, tigeciclina e sulfonamida; e desempenha um papel importante na resistência adquirida, assim como o sistema *AdeABC*, que é o sistema principal nesse tipo de resistência [Coyne et al. 2011].

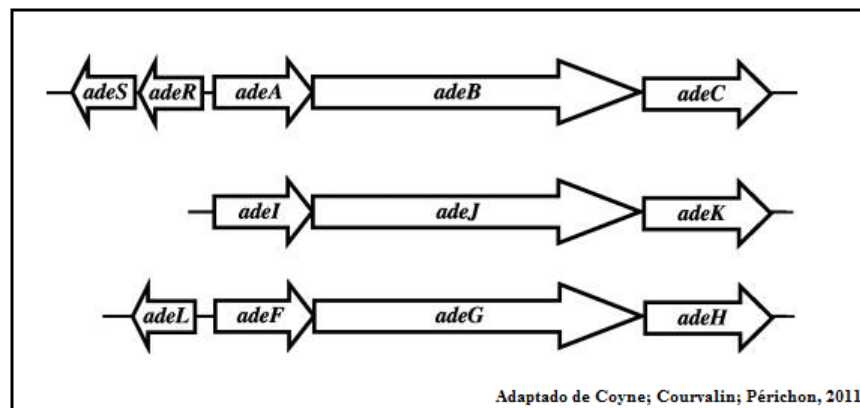


Figura 2: Representação de operons dos principais sistemas de efluxo RND, em *Acinetobacter*.

*AdeABC* foi identificado no ano de 2001, em cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* [Manget et al. 2001]. É responsável pela redução da suscetibilidade para um amplo espectro de antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, cloranfenicol e trimetoprima [Nemec et al. 2007; Magnet et al. 2001]. É composto por três genes agrupados e contíguos: *adeA*, *adeB* e *adeC* que codificam, respectivamente, uma proteína transmembrana, um transportador e uma proteína de membrana externa, característicos da família RND [Piddock 2006a]. Esses três genes são



orientados diretamente e parecem formar um operon, precedido por um sistema regulatório composto pelos genes *adeR* e *adeS* [Marchand et al. 2004]. A redução da suscetibilidade associada ao sistema de efluxo *AdeABC* tem sido atribuída à sua superexpressão constitutiva e à mutações nos genes regulatórios, embora alguns estudos indiquem que a superexpressão do gene *adeB*, que codifica o transportador em si, seja o principal fator associado à multirresistência [Magnet et al. 2001; Dal et al. 2013].

Estudos anteriores deste grupo de pesquisa detectaram genes de resistência, determinaram o perfil de suscetibilidade [Ferreira 2010] e verificaram a presença de bombas de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp., clínicos e ambientais [Marchetti DP 2010]. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença dos genes estruturais e regulatórios da bomba *AdeABC* nesses isolados e comparar os resultados obtidos com os resultados dos estudos prévios, confirmando a presença da bomba e identificando os genes essenciais para seu funcionamento, a fim de elucidar os possíveis mecanismos de resistência, em isolados de *Acinetobacter* sp., coletados em hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Considerando a importância clínica de *Acinetobacter*, a elucidação dos seus mecanismos de resistência é de extrema importância, de modo que muito tem sido estudado sobre cepas multirresistentes; mesmo assim, ainda há muito para descobrir e discutir nesse assunto, uma vez que o entendimento sobre como se dá o fenômeno da multirresistência é a chave para contornar os grandes problemas por ela gerados.

### 3. ARTIGO

## **Pesquisa dos genes estruturais *adeB* e *adeC*, e regulatórios *adeR* e *adeS*, do sistema de bomba de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp.**

Thaís Hain<sup>1</sup>, Gertrudes Corção<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

<sup>2</sup>Professor Associado IV do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

Endereço para correspondência:

Rua Sarmiento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brasil

Cep: 90050-170

Tel/Fax: + 55 51 33083445

Email: thaishain.ufrgs@gmail.com; corcao@ufrgs.com

### **3.1.RESUMO**

Nas últimas décadas, algumas espécies de *Acinetobacter* têm se apresentado como patógenos oportunistas, causando diversas infecções nosocomiais. Por apresentarem resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos e serem altamente capazes de adquirir outros mecanismos de resistência, esses micro-organismos tendem a desenvolver um fenótipo multirresistente, sendo assim uma causa maior de preocupação em ambiente hospitalar. Uma das principais formas de resistência em *Acinetobacter* é a expressão de bombas de efluxo; o sistema *AdeABC*, da família resistência-nodulação-divisão, utiliza a força próton motiva para catalisar o efluxo de diversos agentes antimicrobianos. Neste estudo, a presença dos genes estruturais, *AdeB* e *AdeC*, e dos regulatórios, *AdeR* e *AdeS*, da bomba *AdeABC* foi pesquisada em isolados multirresistentes de *Acinetobacter* sp., através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Dentre os 98 isolados testados, 31 apresentaram todos os genes da bomba *AdeABC*, 30 tiveram todos os genes ausentes e os outros 37 apresentaram pelo menos um dos genes. Esses dados foram comparados com os resultados dos testes de concentração inibitória mínima, obtidos em um estudo anterior, demonstrando a presença e identificando os genes essenciais para o funcionamento da bomba *AdeABC*. Quando a presença da bomba não foi verificada, outros possíveis mecanismos foram sugeridos como responsáveis pela formação do perfil de multirresistência.

Palavras-chave: *Acinetobacter*, multirresistência, bomba de efluxo, *AdeABC*

### 3.2.INTRODUÇÃO

*Acinetobacter* é um gênero de cocobacilos Gram-negativos, que compreende atualmente pelo menos 36 espécies [Peleg et al. 2012]. Pode ser encontrado em vários tipos de solo, água e alimentos, assim como na pele. A maioria das espécies de *Acinetobacter* é considerada não-patogênica para o ser humano, porém, nas últimas décadas, *Acinetobacter* spp. têm se apresentado como patógenos oportunistas, responsáveis por um grande número de infecções nosocomiais [Magnet et al. 2001]. Essas infecções, que podem ocorrer de forma esporádica ou em surtos, acometem principalmente pacientes em estado grave e com tempo de internação prolongado. As principais manifestações são no sistema respiratório e urinário, incluindo pneumonia e septicemia [Coyne et al. 2011].

As espécies de maior importância clínica, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, são responsáveis pela maioria dos casos de infecção. Esse grupo de espécies é conhecido como complexo *A. baumannii* [Peleg et al. 2008]. A principal característica que faz de *Acinetobacter* uma causa maior de preocupação em ambiente hospitalar, é a resistência intrínseca a diversas classes de agentes antimicrobianos [Coyne et al. 2011], além da alta capacidade de desenvolver diversos mecanismos de resistência, que tornam as infecções difíceis de tratar e potencialmente letais [Dijkshoorn et al. 2007].

Mecanismos de resistência podem ser intrínsecos, como na produção de enzimas e membranas de baixa permeabilidade, ou adquiridos, através da transferência de material genético exógeno ou de mutações em genes endógenos [Yoon et al. 2013]. Os principais mecanismos apresentados por *Acinetobacter* são: alterações na permeabilidade da membrana externa, alterações nos sítios de ligação de antimicrobianos, produção de enzimas utilizadas na inativação das drogas e expressão de bombas de efluxo específicas [Munoz-Price e Weinstein 2008].

As bombas de efluxo constituem uma classe de transportadores, responsáveis pela excreção de subprodutos metabólicos e substâncias tóxicas, captação de nutrientes e comunicação intercelular [Li e Nikaido 2004]. Diversos antimicrobianos são considerados substratos para essas bombas, podendo levar ao aumento da expressão gênica codificante e desenvolver, em conjunto com outros mecanismos, um alto perfil de multirresistência [Magnet et al. 2001]. Em *Acinetobacter*, a resistência está associada principalmente à família resistência-nodulação-divisão (RND), pertencente ao grupo de bombas de efluxo dependentes da força próton motiva.

O sistema RND funciona através do antiporte de prótons e drogas, através dele é catalisado o efluxo de diversos agentes antimicrobianos e quimioterápicos [Piddock 2006b]. Em 2001 foi identificado, em cepas multirresistentes de *A. baumannii*, um sistema de efluxo tripartido denominado *AdeABC*, que é responsável pela redução da suscetibilidade para um amplo espectro de antimicrobianos [Magnet et al. 2001]. *AdeABC*, composto por três genes agrupados e contíguos: *adeA*, *adeB* e *adeC* que codificam, respectivamente, uma proteína transmembrana, um transportador e uma proteína de membrana externa, característicos da família RND. Esses três genes são orientados diretamente e precedidos por um sistema regulatório, composto pelos genes *adeR* e *adeS* [Marchand et al. 2004]. A redução da suscetibilidade associada a esse sistema tem sido atribuída a sua superexpressão constitutiva e a mutações nos genes regulatórios, embora alguns estudos apontem o gene *adeB* como principal fator associado à multirresistência [Dal et al. 2013].

Para contornar os problemas gerados por micro-organismos multirresistentes, a identificação e a compreensão dos mecanismos de resistência por eles utilizados são fundamentais. Estudos anteriores deste grupo de pesquisa detectaram genes de resistência [Ferreira 2010] e verificaram a presença de bombas de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp. clínicos e ambientais [Marchetti DP 2010]. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença dos genes estruturais e regulatórios da bomba *AdeABC* e comparar os resultados obtidos com os dos estudos prévios, a fim de elucidar os possíveis mecanismos de resistência, em isolados de *Acinetobacter* sp., coletados em hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

### 3.3.MATERIAIS E MÉTODOS

#### *Isolados de Acinetobacter sp.*

Os isolados de *Acinetobacter* sp. utilizados neste estudo são provenientes de amostras coletadas em hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil. Os isolados de ambiente foram obtidos a partir de amostras coletadas de efluente hospitalar, enquanto os isolados clínicos foram obtidos nos laboratórios de análises de quatro hospitais da cidade, na mesma época em que as amostras de efluente foram coletadas, estas em três hospitais. A coleta, isolamento e identificação foram realizados em um estudo anterior [Ferreira 2010]. Depois destas etapas, os isolados foram armazenados em caldo BHI com 20% de glicerol e mantidos a -20°C.

### *Cepas selecionadas para análise*

Para análise no presente estudo, foram selecionados 72 isolados clínicos e 26 isolados de efluente hospitalar, totalizando 98 isolados de *Acinetobacter* sp.. A escolha das cepas foi baseada em dois estudos anteriores.

No primeiro, o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados foi determinado através da técnica de disco difusão em Ágar Muller-Hinton, os antimicrobianos utilizados foram: amicacina, aztreonam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixona B e ticarcilina-clavulanato [Ferreira 2010]. Os isolados resistentes a quatro ou mais classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes.

No segundo estudo, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (MIC) para as cepas classificadas como multirresistentes. No MIC foram usados três antimicrobianos, amicacina (AMI), ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP). Os isolados foram considerados resistentes aos compostos quando a MIC foi maior que 64 µg/ml para AMI, 32 µg/ml para CAZ e 16 µg/ml para IMP. Foi realizado ainda um segundo MIC, desta vez com a presença de um desacoplador da força próton motiva, a carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP); a redução da MIC em pelo menos duas vezes verifica a presença de sistemas de bombas de efluxo [Marchetti DP 2010].

### *Amplificação dos genes *adeB*, *adeC*, *adeR* e *adeS**

A extração do DNA dos isolados multirresistentes, através do método de fervura, segundo Misbah *et al*, foi realizada num estudo anterior [Gusatti CS 2011]. O material genético ficou armazenado em freezer a -20°C; alíquotas foram diluídas em água Mili-Q na concentração de 1:5, que após alguns testes se mostrou a mais adequada para a utilização nas reações de cadeia da polimerase (PCR). Esse material foi utilizado no presente estudo como alvo para detecção dos genes estruturais - *adeB* e *adeC* - e regulatórios - *adeR* e *adeS* - constituintes da bomba de efluxo *AdeABC*.

A tabela 1 mostra os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados, suas respectivas sequências e temperaturas ótimas de anelamento, segundo informações do fabricante.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações e respectivas temperaturas de anelamento

Primer	Sequência	T <sub>m</sub> (50mM NaCl)
adeB-F	5' - TTA ACG ATA GCG TTG TAA CC - 3'	50.1°C
adeB-R	5' - TGA GCA GAC AAT GGA ATA GT - 3'	51.1°C
adeC-F	5' - AGC CTG CAA TTA CAT CTC AT - 3'	51.8°C
adeC-R	5' - TGG CAC TTC ACT ATC AAT AC - 3'	49.6°C
adeR-F	5' - ACT ACG ATA TTG GCG ACA TT - 3'	51.4°C
adeR-R	5' - GCG TCA GAT TAA GCA AGA TT - 3'	50.7°C
adeS-F	5' - TTG GTT AGC CAC TGT TAT CT - 3'	51.0°C
adeS-R	5' - AGT GGA CGT TAG GTC AAG TT - 3'	53.3°C

Todas as ampliações foram realizadas em um aparelho termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), nas seguintes condições: um período inicial de desnaturação a 94°C por 2min, seguido de 30 ciclos de anelamento, com temperatura específica para cada par de *primers* (Tabela 2), extensão a 72°C e desnaturação a 94°C, cada uma das etapas com duração de um minuto e, ao fim dos 30 ciclos, uma etapa de extensão a 72°C, com duração de oito minutos. Para cada reação foram utilizados: 1µM de cada primer, 1U (unidade) de Taq polimerase, 1x de tampão de reação da Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano e as respectivas concentrações de MgCl<sub>2</sub> e dNTPs da tabela abaixo, em um volume final de 25µL.

**Tabela 2.** Tamanho esperado, temperatura de anelamento, e concentrações específicas para cada gene amplificado

Gene	Tamanho/pb	T <sub>m</sub>	[ ] MgCl <sub>2</sub>	[ ] dNTPs
adeB	541	50°C	3,5mM	0,3mM
adeC	560	49°C	4,5mM	0,3mM
adeR	447	52°C	3mM	0,2mM
adeS	544	52°C	3mM	0,2mM

Observando que as condições ideais eram as mesmas para os genes *adeR* e *adeS*, e os tamanhos esperados de seus fragmentos tinham uma diferença distinguível de aproximadamente 100pb, as reações desses genes foram realizadas no sistema multiplex.

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a corrida ocorreu em tampão TAE 1x, a 80mV, por aproximadamente uma hora, o corante utilizado foi o brometo de etídeo. Os géis foram visualizados e fotografados com o equipamento KODAK 1D.

### 3.4.RESULTADOS

Os resultados obtidos nas reações de amplificação realizadas neste estudo, que mostram a presença ou ausência dos genes *adeB*, *adeC*, *adeR* e *adeS*, estão apresentados nas tabelas 3 e 4, referentes aos isolados de efluente hospitalar e isolados clínicos, respectivamente. As tabelas também apresentam a informação sobre a presença de *adeA* e os resultados dos testes de concentração inibitória mínima (MIC) e destes testes na presença de um desacoplador da força próton motiva (CCCP), obtidos de um trabalho anterior [Marchetti 2010], para facilitar a comparação entre os resultados dos estudos.

**Tabela 3.** Presença dos genes de *AdeABC*, resultado do MIC para os antimicrobianos e MIC na presença de CCCP, em isolados de efluente hospitalar.

	Presença dos genes					Amicacina*		Ceftazidima*		Imipenem*	
	adeA*	adeB	adeC	adeR	adeS	MIC	CCCP	MIC	CCCP	MIC	CCCP
A3	+	+	+	+	+	32	32	256	256	-	-
A5	+	-	+	+	+	<1	0	8	0	-	-
A16	+	-	+	+	+	<1	0	16	0	-	-
A21	+	-	+	+	+	8	8	64	64	-	-
A23	+	-	+	+	+	<1	0	8	0	-	-
A26	+	+	+	+	+	<1	0	8	0	-	-
A81	-	-	+	+	+	32	16	128	128	-	-
A104	-	-	-	-	-	<1	0	>512	>512	-	-
A117	-	-	+	+	+	16	8	8	8	128	128
D2	-	-	-	-	-	<1	0	32	32	-	-
D7	-	-	-	-	-	<1	0	16	16	-	-
G9	+	-	+	+	+	<1	0	32	0	-	-
G13	+	-	+	+	+	<1	0	64	64	-	-
G35	-	-	-	-	-	<1	0	16	0	-	-
G46h	+	+	+	+	+	<1	0	16	0	-	-
G47h	+	+	+	+	+	32	16	16	0	32	32
C22h	-	-	-	-	-	<1	0	8	0	32	32
O1	+	+	+	+	+	<1	0	8	0	-	-
O2	+	+	+	+	+	32	32	>512	>512	-	-
O3	+	-	+	+	+	8	4	16	8	-	-
O4	+	-	+	+	+	<1	0	16	16	-	-
O6	+	-	+	+	+	32	0	16	8	32	32
O15	+	-	+	+	+	<1	0	8	0	-	-
O18	+	-	+	+	+	<1	0	8	0	32	32
O33	+	+	+	+	+	<1	0	64	32	-	-
O34	+	+	+	+	+	<1	0	>512	>512	-	-

\*Os resultados de *adeA* e dos MICs foram obtidos em estudo anterior [Marchetti 2010].

Dentre os 26 isolados de efluente, oito (30,8%) apresentaram todos os genes do sistema *AdeABC* e cinco (19,23%) foram negativos para todos eles. Nos demais isolados,

onze (42,31%) apresentaram todos os genes exceto *adeB* e os outros dois não tinham a presença de *adeA*, nem de *adeB* (tabela 3).

Dos 72 isolados clínicos, 23 (31,94%) apresentaram os cinco genes e 25 (34,72%) foram negativos para todos os genes. Nos demais, sete (9,72%) mostraram ausência apenas de *adeB*, cinco tinham mais de um gene ausente, incluindo *adeB* e 14 apresentaram o gene *adeB* mas tiveram pelo menos um dos outros genes ausentes.

Entre os isolados ambientais pode ser observada maior proporção de isolados portadores dos genes para o sistema *AdeABC* do que entre os clínicos. Foi observada também uma proporção maior de isolados com ausência do gene *adeB*, mesmo entre cepas consideradas resistentes e com fenótipo de bomba de efluxo.

**Tabela 4.** Presença dos genes de *AdeABC*, resultado do MIC para os antimicrobianos e MIC na presença de CCCP, em isolados clínicos.

	Presença dos genes					Amicacina*		Ceftazidima*		Imipenem*	
	adeA*	adeB	adeC	adeR	adeS	MIC	CCCP	MIC	CCCP	MIC	CCCP
16	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	16	16
23	+	-	+	+	+	<1	0	-	-	16	16
30	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	32	32
32	+	-	-	+	+	32	32	-	-	32	32
44	+	-	-	+	+	<1	0	-	-	-	-
50	+	-	+	+	+	<1	0	-	-	-	-
52	+	-	+	+	+	32	32	-	-	-	-
53	+	+	-	+	+	128	64	-	-	128	128
54	+	-	+	+	+	<1	0	-	-	-	-
70	+	+	+	+	+	256	32	-	-	32	16
79	+	+	-	+	+	<1	0	-	-	-	-
103	+	+	+	+	+	<1	0	8	2	256	2
104	+	-	-	+	+	64	16	64	64	32	32
105	+	-	+	+	+	8	8	-	-	-	-
106	+	+	+	+	+	<1	0	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	32	32	8	0	64	4
122	-	-	-	-	-	<1	0	8	8	256	128
123	-	-	-	-	-	2	0	256	256	64	<1
124	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	-	-
133	-	-	-	-	-	16	8	64	64	64	64
143	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	-	-
146	-	-	-	-	-	16	16	512	512	128	64
147	-	-	-	-	-	16	4	-	-	16	16
149	+	+	+	+	+	256	32	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	32	32	-	-	-	-
158	+	+	+	+	+	<1	0	-	-	16	16
188	+	+	-	-	-	64	8	-	-	32	32



**Tabela 4.** Continuação

	Presença dos genes					Amicacina*		Ceftazidima*		Imipenem*	
	adeA*	adeB	adeC	adeR	adeS	MIC	CCCP	MIC	CCCP	MIC	CCCP
190	-	-	-	-	-	<1	0	128	8	256	8
194	+	-	-	-	-	16	8	64	16	256	128
199	-	-	-	-	-	4	4	128	128	256	64
202	-	-	-	-	-	4	0	512	0	128	32
204	-	-	-	-	-	64	4	-	-	-	-
205	+	+	-	-	-	<1	0	64	0	16	<1
217	+	+	+	+	+	64	64	-	-	-	-
220	+	+	+	+	+	32	32	-	-	128	64
233	+	+	+	+	+	<1	0	-	-	-	-
239	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	-	-
250	+	+	+	-	-	<1	0	-	-	-	-
254	+	+	+	+	+	16	4	64	64	2	2
255	+	+	+	+	+	128	128	64	64	2	2
261	+	+	+	+	+	32	0	-	-	-	-
264	+	+	+	+	+	2	2	8	8	8	<1
265	+	+	-	+	+	4	4	-	-	-	-
266	+	+	-	+	+	32	8	-	-	-	-
267	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	16	16
269	-	+	+	+	+	256	128	128	128	16	<1
270	+	+	-	+	+	<1	0	8	0	64	32
273	+	+	+	+	+	<1	0	16	0	64	64
274	+	+	+	+	+	8	8	>512	>512	2	2
275	+	+	+	+	+	<1	0	-	-	64	64
279	+	+	+	+	+	16	16	16	0	64	64
280	+	+	+	+	+	64	32	128	128	16	2
282	+	+	+	+	+	64	16	64	64	32	32
283	+	+	+	+	+	8	4	>512	>512	32	32
284	+	+	+	+	+	8	8	>512	>512	32	16
288	+	+	+	+	+	16	16	-	-	-	-
289	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-	-
291	+	+	-	+	+	4	4	-	-	-	-
294	-	+	+	-	-	32	32	-	-	16	8
297	-	+	-	+	+	32	8	-	-	-	-
298	+	+	+	+	+	<1	0	>512	256	256	16
299	-	-	-	-	-	<1	0	-	-	32	16
301	-	-	-	-	-	16	16	-	-	16	8
302	-	-	-	-	-	8	8	-	-	32	32
304	+	+	+	-	-	<1	0	256	256	64	<1
306	+	+	+	+	+	<1	0	32	0	128	<1
311	-	-	-	-	-	<1	0	4	0	32	1
312	-	-	-	-	-	<1	0	32	0	64	<1
314	+	+	+	-	-	16	16	-	-	16	16
317	+	+	-	-	-	16	8	128	64	64	4
322	-	-	-	-	-	16	16	64	64	256	16

\*Os resultados de *adeA* e dos MICs foram obtidos em estudo anterior [Marchetti 2010].

### 3.5.DISCUSSÃO

A associação entre multirresistência em *Acinetobacter* e a presença de bombas de efluxo tipo RND é bastante conhecida e bem fundamentada. *AdeABC* é um sistema de efluxo pertencente à essa família, regulado pelo sistema *AdeRS*, e muito importante na formação de um fenótipo multirresistente em *Acinetobacter* [Magnet et al. 2001].

Neste estudo foi realizada, através da técnica de PCR, uma pesquisa dos genes estruturais, *adeB* e *adeC*, e dos regulatórios, *adeR* e *adeS*, em 98 isolados de *Acinetobacter* sp., provenientes de amostras clínicas e ambientais, coletadas em hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma comparação entre os resultados dessa pesquisa e resultados de testes feitos anteriormente com os isolados [Marchetti 2010], permite inferir os mecanismos de resistência presentes nessas amostras.

Entre os isolados clínicos foram observados níveis maiores de resistência para os três antimicrobianos testados, o que pode ser explicado pela pressão seletiva maior que estes sofrem ao infectar um hospedeiro. Todavia, como a presença de bomba de efluxo não tem ação de pressão seletiva, foi observada uma proporção maior de isolados ambientais com esta característica. Para o imipenem, pode-se observar que entre os isolados ambientais a resistência foi baixa e em nenhum isolado foi observada redução na presença do CCCP, indicando que esta resistência pode ser determinada por genes tipo *bla*. Por outro lado, entre os isolados clínicos o nível de resistência foi maior para este antimicrobiano e a redução na presença de CCCP foi observada em 24 dos 43 isolados resistentes. Portanto, neste caso pode-se inferir da participação do sistema de bomba de efluxo e presença de genes tipo *bla*, como descrito por Lee et al. 2010.

Nos 26 isolados ambientais, foi observado pelos resultados dos testes de concentração inibitória mínima, que 15 apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos. Apenas um desses (O33) apresentou redução de MIC na presença de CCCP e foi positivo para os cinco genes, o que indica resistência devido a bomba *AdeABC*; nos outros catorze, possivelmente outro mecanismo que não o da bomba de efluxo é responsável pela resistência.

Dois isolados foram negativos para os genes e não apresentaram resistência no teste de MIC, caracterizando cepas ainda sensíveis. Seis isolados apresentaram redução de MIC na presença de CCCP, porém os valores de MIC não eram suficientes para caracterizar resistência; esses isolados apresentavam ausência do gene *adeB*, fato que pode explicar a

baixa resistência mostrada no teste de MIC, principalmente para ceftazidima, alguns estudos caracterizam o gene *adeB* como sendo o principal gene responsável pelo funcionamento de *AdeABC* [Magnet et al. 2001; Dal et al. 2013]. Três isolados apresentaram todos os genes, mas não foram considerados resistentes pelo teste de MIC, Bratu et al. 2008, observaram mutações pontuais nos genes *adeR* e *adeS*, o que pode explicar esta ausência de resistência nestes isolados.

Nos 72 isolados clínicos, 50 apresentaram resistência pelo teste de MIC, pelo menos a um dos antimicrobianos testados. Destes, oito mostraram redução de MIC na presença de CCCP e apresentaram os cinco genes, mostrando que *AdeABC* é responsável pela resistência nesses isolados. Oito isolados apresentaram características semelhantes, mas com ausência de alguns genes, *adeB* estava presente nesses isolados, isso mostra que sua expressão, independente dos outros genes, pode ser responsável pela resistência. Outros 13 isolados apresentaram redução de MIC com CCCP, mas não tinham os genes testados, indicando que estes isolados devem possuir outra bomba de efluxo dependente da força próton motiva, Lin et al. 2009, mostraram através de uma pesquisa dos genes de várias bombas de efluxo em *Acinetobacter*, que outras bombas são ativas quando *AdeABC* não funciona ou não está presente. Apenas dois isolados sem *adeB* e algum outro gene apresentaram resistência e redução de MIC, tanto *AdeABC* quanto outra bomba pode estar conferindo a resistência nesses casos.

Nove isolados, resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, não apresentaram redução de MIC com CCCP, portanto outro mecanismo que não bomba de efluxo (dependente da força próton motiva) deve estar conferindo essa resistência. Os outros dez isolados resistentes apresentaram redução de MIC na presença de CCCP para algum antimicrobiano, mas também mostraram resistência sem redução para outro, indicando que mais mecanismos, além da bomba de efluxo, estão presentes; cinco deles tinham os genes para *AdeABC* enquanto os demais devem ter outra bomba que utiliza força próton motiva.

Vinte e dois isolados clínicos não apresentaram resistência, sendo que seis deles também não tinham nenhum dos genes do sistema *AdeABC*. Seis isolados apresentaram todos os genes testados, mas não foram considerados resistentes no teste de MIC. Cinco isolados não resistentes tinham dois ou mais genes ausentes, em três desses isolados, os genes ausentes eram os regulatórios, o que pode explicar a baixa resistência observada no MIC. Cinco isolados não resistentes mostraram ausência de *adeB*, enquanto os outros genes da bomba

estavam presentes, o que indica, mais uma vez, que *adeB* é fundamental para o funcionamento da bomba *AdeABC*, como sugerido por Magnet et al. 2001.

Levando em conta a presença dos cinco genes que fazem parte dos sistemas *AdeABC* e *AdeRS*, os valores de MIC e a redução, ou não, desses valores na presença de um inibidor da bomba de prótons (CCCP), várias hipóteses foram aqui levantadas para auxiliar na compreensão dos mecanismos que levaram à multirresistência nos isolados de *Acinetobacter* utilizados neste trabalho.

### 3.6.REFERÊNCIAS

Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging infectious diseases*, v.11, p.22-29, 2005.

Bratu S, Landman D, Martin DA, C, Quale, J. Correlation of Antimicrobial Resistance with  $\beta$ -Lactamases, the OmpA-Like Porin, and Efflux Pumps in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 52, p. 2999–3005, 2008

Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.55(3), p.947-953, 2011.

Dal T, Aksu B, Pagès JM, Over-Hasdemir U. Expression of the *adeB* gene and responsiveness to 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanyl-arginyl- $\beta$ -naphthylamide in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.68, p.1200-1211, 2013.

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p.939-951, 2007.

Ferreira AE. Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar. Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

Gusatti CS. Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp.: presença de ISAbal e diversidade de blaOXA-51-like. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, v.3(3), p.243-250, 2012.

Huang L, Sun L, Xu G, Xia T. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.62, p.326-332, 2008.

Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.65, p.1975-1983, 2010.

Lee Y, Yum JH, Kim CK, Yong D, Jeon EH, Jeong SH, Ahn JY, Lee K. Role of OXA-23 and AdeABC Efflux Pump for Acquiring Carbapenem Resistance in an *Acinetobacter baumannii* Strain Carrying the bla<sub>OXA-66</sub> Gene. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v.40(1), p.43-48, 2010.

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, v.62(2), p.159-204, 2004.

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an Update. *Drugs*, v.69(12), p.1555-1623, 2009.

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p.3375-3380, 2001.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.3298-3304, 2004.

Marchetti DP. Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* spp. Trabalho de conclusão de curso em Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

Munoz-Price LS and Weinstein RA. Acinetobacter infection. *The New England Journal of Medicine*, v.358(12), p.1271-1281, 2008.

Nemec A, Maixnerová M, Reijden TJK, Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60, p.483-489, 2007.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, Vanechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology*, v.162(4), p.393-404, 2011.

O'Shea MK, *Acinetobacter* in modern warfare. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.39, p.363-375, 2012.

Peleg AY, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.21(3), p.538-582, 2008.

Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, et al. The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLoS ONE*, v.7(10), e46984, 2012.

Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19(2), p.382-402, 2006a.

Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v.4, p.629-636, 2006b.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, p.1210-1215, 2007.

Yoon EJ, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-Type Efflux Pumps in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*: Major Role for AdeABC Overexpression and AdeRS Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57(7), p.2989-2995, 2013.

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através desse estudo foi possível confirmar a presença, e o funcionamento, da bomba *AdeABC* em isolados de *Acinetobacter* sp., sendo que a presença de *AdeABC* pode ser observada em maior proporção nos isolados ambientais, assim como a ausência apenas do gene *adeB*. Além disso, a análise dos resultados revelou tendências no perfil de alguns isolados, que corrobora os achados de Lee et al. 2010, sobre a associação entre genes *bla* e a bomba *AdeABC* na resistência a carbapenêmicos, e de Magnet et al. 2001 sobre a importância do gene *adeB* que, como codificador da proteína transportadora, se mostrou essencial para o funcionamento do sistema *AdeABC*.

Ainda serão necessários mais estudos para entender porque alguns isolados apresentaram todos os genes do sistema *AdeABC* e do sistema regulatório, e ainda assim não apresentaram resistência nos testes de MIC. A utilização de PCR em tempo real, que seria uma ferramenta interessante para avaliar a expressão desses genes, e a pesquisa de outros sistemas de efluxo, são necessários para esclarecer o motivo do não funcionamento da bomba *AdeABC*, e também elucidar os outros mecanismos, envolvidos no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, presentes nos isolados estudados.