

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação de métodos moleculares para detecção de *Acinetobacter baumannii*
multidroga resistentes recuperados de pacientes com suspeita de pneumonia
associada à ventilação mecânica.

Mirna Giselle Moreira

Belo Horizonte
2017

Mirna Giselle Moreira

Avaliação de métodos moleculares para detecção de *Acinetobacter baumannii*
multidroga resistentes recuperados de pacientes com suspeita de pneumonia
associada à ventilação mecânica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia, Núcleo de Pesquisa em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para título de Doutor
em Microbiologia.

Orientador: Simone Gonçalves dos Santos
Coorientador: Vandack Alencar Nobre Jr.

Belo Horizonte, Minas Gerais

2017

AGRADECIMENTOS

Como agradecer ao meu **Deus** por todo seu cuidado e fidelidade, não há palavras que possam expressar minha gratidão!

A minha **mãe** Maria José e ao meu **pai** Fernando, que sempre me encorajaram a ir além.

A **Ana, Nana, Jéssica** irmãs de teto que me mostraram um novo sentido de lar.

A **Simone**, que começou como minha orientadora e hoje a tenho como uma amiga!

Ao **Luiz** e a **Paula**, que fazem com que todos do nosso laboratório se sintam parte de uma família.

A todos os meus **amigos** de Montes Claros, que mesmo longe sempre se fizeram presentes.

Aos novos **amigos** de Belo Horizonte, sei que os levarei aonde for.

As minhas alunas de iniciação científica, **Larissa, Ana e Cássia**, a conquista é nossa.

A **Lídia**, tenho uma gratidão eterna a toda ajuda cedida a mim.

Ao **Vandack**, sempre solecista e atencioso, obrigada por cada contribuição.

Ao **Carlos, Tatiana, Antônio e Anna Gabi**, a colaboração de vocês me tornaram uma profissional muito melhor, obrigada pelo conhecimento compartilhado.

A todos os pacientes e responsáveis que aceitaram a fazer parte deste estudo, grata sou pela confiança.

A todos do **MOA**, somos realmente uma família científica feliz, sentirei saudades!!

COLABORAÇÃO

- Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias - Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB/UFMG.
- Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia dos Santos - Laboratório de Microbiologia aplicada, ICB/UFMG.
- Doutoranda- Ana Gabriela Guimarães- Departamento de pós-graduação em Microbiologia, ICB/UFMG.
- Doutoranda- Lídia Miranda Barreto- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina/UFMG.
- Prof^a. Dra. Andrea de Souza Monteiro- Universidade Ceuma, São Luis, Maranhão.
- Dr^o. Carlos Henrique Camargo- Núcleo de doenças entéricas e infecções por patógenos especiais, Centro de bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, SP.
- Doutoranda- Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira- Técnica do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais – LDDV pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais - LANAGRO-MG.
- Dr^o. Antonio Augusto Fonseca Júnior- Auditor Fiscal Federal Agropecuário do Laboratório de Biologia Molecular - Divisão de Biossegurança, pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG.

RESUMO

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. O gênero *Acinetobacter* representa um importante patógeno relacionado a infecções hospitalares, principalmente em pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV). O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de métodos moleculares no diagnóstico laboratorial de *Acinetobacter baumannii* isolados de lavado broncoalveolar (mini-BAL), obtidos de pacientes adultos com suspeita de PAV em unidade de terapia intensiva do hospital das clínicas de Minas Gerais. A cultura quantitativa das amostras de mini-BAL foi utilizada como comparação aos resultados obtidos através da avaliação dos resultados das técnicas moleculares sendo elas: FISH, LAMP, PCR convencional, qPCR (*SYBR*[®] *Green*, *TaqMan*[®]) e ddPCR. Foram coletadas 44 amostras de mini-BAL e destas, oito foram positivas em cultura para *A. baumannii* todas elas multidroga resistentes. A técnica de FISH não houve hibridização em concordância quando comparada aos controles utilizados. LAMP a técnica é sensível e versátil, houve sucesso na padronização na pesquisa de *bla*_{NDM-1} apresentando uma concordância em 100% com os resultados da PCR convencional, porém para os outros iniciadores pesquisados como; região ITS, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{KPC-2}, foram detectados falsos positivos quando comparados com a PCR. Na comparação das três gerações da PCR frente ao alvo testado, a PCR convencional demonstrou boa especificidade e sensibilidade, houve uma correlação de 75% dos produtos amplificados aos resultados de cultura quantitativa. O *SYBR*[®] *Green* demonstrou baixa especificidade ao painel de bactérias testado, tornando a quantificação das amostras de mini-BAL questionáveis. O *TaqMan*[®] mostrou boa sensibilidade e especificidade com limite de detecção igual ao obtido com o *SYBR*[®] *Green*, 1,02 pg/μl, porém houve uma discrepância na quantificação das 44 amostras de mini-BAL em comparação com a cultura quantitativa. A sensibilidade e especificidade da técnica de ddPCR se mostrou excelente, houve uma perfeita correlação dos resultados da quantificação absoluta das amostras de mini-BAL, aos resultados de cultura quantitativa demonstrando ser uma técnica precisa e extremamente eficiente. Portanto através dos resultados obtido com a PCR convencional demonstrou ser uma boa técnica para detecção e a ddPCR demonstrou ser mais acurada e sensível podendo ser utilizada como uma ferramenta para acompanhamento do processo infeccioso e para descalonamento da terapia antimicrobiana usada.

ABSTRACT

Health Care Related Infections (IRAS) are considered one of the biggest public health problems in the world. The genus *Acinetobacter* represents an important pathogen related to hospital infections, mainly in ventilator-associated pneumonia (VAP). The objective of this study was to evaluate the performance of molecular methods in the laboratory diagnosis of *Acinetobacter baumannii* isolated from bronchoalveolar lavage (mini-BAL), obtained from adult patients with suspected VAP in an intensive care unit of the hospital of the clinics of Minas Gerais. The quantitative culture of the mini-BAL samples was used to compare the results obtained by evaluating the results of the molecular techniques: FISH, LAMP, conventional PCR, qPCR (*SYBR*[®] *Green*, *TaqMan*[®]) and ddPCR. A total of 44 mini-BAL samples were collected and eight of them were culture positive for *A. baumannii* all of them multidrug-resistant. The FISH technique showed no hybridization in agreement when compared to the controls used. LAMP the technique is sensitive and versatile, there was success in the standardization in the bla_{NDM-1} research presenting one agreeing in 100% with the results of conventional PCR, however for the other initiators researched as; ITS region, bla_{OXA-51} and bla_{KPC-2}, false positives were detected when compared to PCR. In the comparison of the three generations of the PCR against the tested target, the conventional PCR showed good specificity and sensitivity, there was a correlation of 75% of the amplified products to the results of quantitative culture. *SYBR*[®] *Green* demonstrated low specificity to the bacterial panel tested, making quantification of questionable mini-BAL samples possible. *TaqMan*[®] showed good sensitivity and specificity with detection limit equal to that obtained with *SYBR*[®] *Green*, 1.02 pg / µl, but there was a discrepancy in the quantification of the 44 mini-BAL samples compared to the quantitative culture. The sensitivity and specificity of the ddPCR technique proved to be excellent, there was a perfect correlation of the results of the absolute quantification of the mini-BAL samples, to the quantitative culture results proving to be a precise and extremely efficient technique. Therefore, the results obtained with conventional PCR proved to be a good technique for detection and ddPCR proved to be more accurate and sensitive and could be used as a tool for monitoring the infectious process and for descaling the antimicrobial therapy used.

SUMÁRIO

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Lista de siglas e abreviaturas.....	8
Lista de figuras.....	11
Lista de tabelas.....	12
1. Revisão da literatura.....	13
2. Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV).....	14
2.1.Patogênese.....	14
2.2.Diagnóstico.....	15
2.3.Tratamento de PAV.....	16
3. <i>Acinetobacter</i> spp.....	16
3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
3.2.Fatores de patogenicidade intrínseco.....	18
3.2.1.Porinas.....	18
3.2.2.Vesículas de membrana externa (OMVs).....	18
3.2.3.Formação de Biofilme.....	19
3.3.Mecanismo de resistência adquiridos.....	19
3.3.1. Produção de β -lactamases.....	19
3.3.2. Produção de enzimas inativadoras de Aminoglicosídeos.....	21
3.3.3.Resistência aos carbapenêmicos.....	22
3.3.4.Resistência as Polimixinas.....	22
4. Técnicas de Biologia Molecular.....	23
4.1. Fluorescent in situ Hybridization (FISH).....	23
4.1.2. Loop mediated isothermal amplification (LAMP).....	24
4.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 1º, 2º e 3º Geração.....	24
5. Métodos de tipagem molecular.....	25
6. Justificativa.....	28
7.Objetivos.....	29
7.1.Objetivo Geral.....	29
7.2.Objetivos específicos.....	29
8. Material e métodos.....	30
8.1.Obtenção dos espécimes clínicas, identificação fenotípicas e teste de suscetibilidade a anti-microbianos.....	31
8.1.1.Coleta do mini-lavado bronco alveolar (mini-BAL).....	31
8.1.2.Cultura quantitativa do mini-BAL.....	32
8.2. Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.....	33
8.3. Aplicação da técnica de Fluorescent In Situ Hybridization (FISH).....	33
8.3.2. Etapas de hibridização das células.....	34
8.3.3.Quantificação das bactérias.....	35
8.4. Análise por amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).....	35
8.4.1. Extração do DNA por lise térmica.....	35
8.4.2.Desenho do iniciador utilizado na reação de LAMP.....	35
8.4.3.Condições de amplificação das reações de LAMP.....	36
8.5. Detecção de variantes da OXA-51 (Artigo 1-Anexo).....	37
8.5.1. Eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	38
8.5.2. Análise por Multilocus sequence Typing (MLST).....	39
8.5.3. Detecção de genes de Beta-lactamases em <i>A. baumannii</i>	40
8.5.4. Detecção dos genes variantes de <i>bla</i> _{OXA-51} em <i>A. baumannii</i>	40
8.5.5. A detecção de outros genes de carbapenemases em <i>A. baumannii</i>	40
8.6. Comparação da especificidade e sensibilidade das três gerações de PCR.....	40
8.6.1. Extração de ácido nucleico.....	40
8.6.2. Ensaio de PCR convencional.....	41
8.6.3. Ensaio com SYBR Green em qPCR.....	41
8.6.4. Ensaio de TaqMan em qPCR.....	41

8.6.5. Ensaio da Droplet Digital PCR ou ddPCR.....	42
8.6.6. Teste para definir a especificidade analítica.....	43
8.6.7. Teste para definir a sensibilidade analítica.....	43
9. Aspectos éticos.....	44
10. Resultados.....	45
10.1. Características dos pacientes avaliados.....	45
10.2. Análise fenotípica.....	46
10.3. Resultados microbiológicos do mini-BAL.....	46
10.4. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras recuperadas.....	47
10.5. Padronização da técnica de Fluorescence in situ Hybridization (FISH).....	47
10.6. Padronização das técnicas de Amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP).....	48
10.7. Detecção das variantes da OXA-51.....	52
10.7.1. Análises genotípicas.....	53
10.7.2. Detecção de genes de OXA carbapenemases nas amostras de <i>A. baumannii</i>	53
10.7.3. Detecção de outros genes de carbapenemases em amostras de <i>A. baumannii</i>	53
10.7.4. Detecção dos genes variantes de <i>bla</i> _{OXA-51} em <i>A. baumannii</i>	53
10.7.5. Eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	54
10.7.6. Análise por Multilocus sequence Typing (MLST).....	55
10.8. Comparação da especificidade e sensibilidade das três gerações de PCR.....	55
10.8.1. Análise da sensibilidade analítica das três gerações de PCR.....	55
10.8.2. Análise da especificidade analítica das três gerações de PCR.....	57
10.8.3. Quantificação e amplificação das 44 amostras de mini-BAL.....	59
11. Discussão.....	62
12. Sumário dos resultados e conclusão.....	69
13. Apresentação de trabalhos e orientação.....	71
14. Referências.....	72
15. Apêndices.....	81
15.1. Artigo I.....	81
Diversity of <i>bla</i> _{OXA-51} variants and its clonal complexes in multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> in patients with ventilator-associated pneumonia.	
15.2. Artigo II.....	83
Rapid detection of the New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM) gene by Loop-Mediated isothermal amplification.	

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

AFLP -*Amplified fragment length polymorphism*
AIM -*Australian imipenemase*
AmpC -Beta-lactamase cromossômica
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA *Amplified ribosomal DNA restriction analysis*
ATCC- *American Type and Culture Collection*
bla- Genes das beta-lactamases
BLAST -*National Center for Biotechnology Information*
BSC- Tampão Tris:EDTA
Ca⁺²- Cálcio
°C- Graus Celsius
CaCl₂ -Cloreto de cálcio
CC -Complexo clonal
CCIH- Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC- *Centers for Disease Control and Prevention*
CG- Cassete gênico
CIM -Concentração Inibitória Mínima
CLSI- *Clinical Laboratory Standards Institute*
CO²- Dióxido de carbono
cpn60 -60-kDa chaperonin
CraA -*Acinetobacter* resistente a clorafenicol
CRAb- *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos
CTI- Centro de Tratamento Intensivo
CTX-M- Beta-lactamase Cefotaximase
DMSO: Dimetilsulfóxido
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol
DIM- Dutch imipenemase
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP -Desorribonucleotídeo trifosfatado
EDTA -Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC-PCR- *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
ESβL -Beta-Lactamase de Espectro Estendido
fusA- *protein elongation factor EF-G*
gdhB- *Glucose dehydrogenase B*
GES- *Guiana extended spectrum beta-lactamase*
GIM- *Germany imipenemase*

HC- Hospital das Clínicas
IRAS- Infecção relacionada à assistência a saúde
IS- Sequência de inserção
ISAbA- Sequência de Inserção de *Acinetobacter baumannii*
ITs -Região intergênica
KHM -Kyorin Hospital metalo-β-lactamase
KPC- *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
LB -Caldo Luria-Bertani
MBL- Metalo beta-lactamase
MDR- Multirresistente
Mg⁺²-Magnésio
MgCl²-Cloreto de Magnésio
MgSO₄-Sulfato de magnésio
MIC -Concentração mínima inibitória
Mini-BAL- Lavado broncoalveolar
mL- Mililitros
MLST -*Multilocus sequence typing*
MLST-IP MLST -desenvolvido pelo Instituto Pasteur
MLST-OD MLST -relacionado ao banco de dados Oxford
MnCl₂-Cloreto de manganês
NaCl- Cloreto de sódio
NaOH- Hidróxido de sódio
NDM- New Delhi Metallo-beta-lactamase
OMS- Organização Mundial da Saúde
OMPs -*Outer membrane proteins*
ORF- *Open reading frame*
OXA- Oxacilinase
PAV -Pneumonia associada à ventilação mecânica
pb- Pares de bases
PBS- Tampão fosfato salino
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
PER -Pseudomonas Extended Resistance
PFA- Paraformaldeído
PFGE -Eletroforese em gel de campo pulsado
pH- Potencial de hidrogênio
pyrG- CTP *synthase*
RAPD- *Randomly amplified polymorphic DNA*
recA- *Homologous recombination factor*
REP-PCR- *Repetitive extragenic palindromic-PCR*
RNA- Ácido ribonucleico
rpm- Rotações por minuto
SDS- Dodecil sulfato de sódio

SENTRY -*Antimicrobial surveillance programme*
SG- Sequência do grupo
SHV- *Beta-lactamase Sulphydryl variable*
SIM -*Seoul imipenemase*
SPM- São Paulo metalo-beta-lactamase
ST -*Sequence type*
TBE -Tampão Tris-borato EDTA
TE -Tampão Tris-EDTA
TEM- Beta-lactamase Temoneira
Tris -Tris(hidroximetil)aminometano
UFC- Unidade formadora de colônia
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
USA- Estados Unidos
UTI -Unidade de terapia intensiva
UV: Ultra-violeta
VEB- Vietnamese extended-spectrum beta-lactamase
VIM -Verona imipenemase
Zn²⁺ -Zinco
WHO- *World Health Organization*

Símbolos:

% – por cento

> – maior ou igual

< – menor ou igual

= – Igual a

~ – Aproximadamente

Lista de figuras

- Figura 1- Tipagem de *A. baumannii* por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *ApaI*.....63
- Figura 2. *eBURST* do complexo clonal construído a partir dos (STs) de amostras clínicas isoladas em todo o mundo, encontrados no banco de dados do website oficial do MLST. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa *eBURST* 3.0 que faz uma ligação dos isolados a partir das diferenças nas sequências de nucleotídeos de somente um dos sete fragmentos de genes utilizados para MLST.....65
- Figura 3. Resultado da visualização do produto amplificado pela técnica de LAMP com o corante *Hidronaftol blue* para amostras de *bla_{NDM-1}*.....68
- Figura 4. Resultado do teste com o intercalante *SYBR[®]Green* visualizado em luz UV, com produto amplificado diluído 1: 100 em DMSO, para amostras de *bla_{NDM-1}* pela técnica de LAMP.....68
- Figura 5- Curva padrão Curva padrão referente ao gene da *bla_{OXA-51}* para as amostras ATCC de *A. baumannii* *TaqMan[®]*. Em Y estão demonstrados os valores da diluição de DNA na escala de 10, sendo 1 (10^1 até 10^6) e os valores de Ct correspondes a cada diluição.....71
- Figura 6- Curva de *Melt* da qPCR pela sistema *TaqMan[®]*, da amostra tipo ATCC 10906 e amostras clínicas de *A. baumannii*.....72
- Figura 7- Quantificação absoluta de copias por microlitros de amostras de lavado broncoalveolar por ddPCR.....76

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos pacientes incluídos no estudo ($n= 44$).....	60
Tabela 2- Ordem de frequência de micro-organismos isolados dos espécimes de mini-BAL avaliados.....	61
Tabela 3- Resultados microbiológicos e valores de amplificação da PCR convencional das amostras de mini-BAL juntamente com a média dos <i>Cts</i> das técnicas de <i>SYBR[®]Green</i> , <i>TaqMan[®]</i> e a quantificação absoluta da ddPCR.....	73

1. Revisão da Literatura

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública de âmbito mundial. Reconhecida como o evento adverso mais frequente durante a prestação de cuidados, estas apresentam impacto negativo sobre morbidade, mortalidade, custos sociais e econômicos para as populações e aos sistemas de saúde em diversos países (JARDIM *et al.*, 2017). As IRAS são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “endemia”, emergindo como um dos maiores desafios da medicina atual (COELHO *et al.*, 2011, NOGUEIRA Jr *et al.*, 2014). No Brasil, a prevalência de IRAS em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) é de 61,6%, cerca de cinco a 10 vezes maior do que em outras unidades hospitalares e a mortalidade dos pacientes acometidos nesse ambiente chega a 40% (BORK *et al.*, 2015).

Os avanços científicos e tecnológicos dos últimos anos levaram a melhora na expectativa de vida, permitindo aumento progressivo e significativo do número de pacientes com idade avançada, contribuindo para uma maior probabilidade de existência de doenças crônicas debilitantes e crescente número de condições de imunossupressão, adquirida ou induzida. Reunidos, esses fatores, aliados ao uso mais frequente de dispositivos invasivos e à vasta prescrição de antimicrobianos, aumentam bastante o risco de aquisição das IRAS e desenvolvimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2012, SOARES *et al.*, 2017).

Diante disso, no ambiente hospitalar há uma emergência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e, com crescimento progressivo nas últimas décadas, constituindo-se uma ameaça à saúde pública em todo mundo. O problema é decorre principalmente do uso indiscriminado e inadequado desses fármacos, seja em âmbito hospitalar ou na comunidade (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A situação agrava-se, uma vez que a multirresistência aos antimicrobianos contribui para o aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes e dos custos relacionados à sua internação e, sobretudo, pela redução ou mesmo ausência de opções terapêuticas para o tratamento dos pacientes acometidos (SOARES *et al.*, 2017).

Bactérias do gênero *Acinetobacter* encontram-se amplamente distribuídas na natureza, são encontradas em materiais inanimados e reservatórios humanos podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto (SADEGHIFARD *et al.*, 2010). Existe uma preocupação crescente em relação à prevalência desta bactéria em ambientes hospitalares, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). *Acinetobacter*

baumannii é o principal representante do gênero *Acinetobacter*, possuindo uma notável capacidade de adquirir resistência à maioria dos antimicrobianos utilizados na prática clínica e de causar surtos, com registros em muitas cidades, países e até continentes. Esta espécie se relaciona a diferentes tipos de infecções, tais como pneumonia associadas à ventilação mecânica (PAV), meningite, bacteremia, infecções do trato urinário e de sítios cirúrgicos (ESPINAL *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015).

2. *Pneumonia associada à ventilação mecânica*

2.1. *Patogênese*

A Ventilação Mecânica (VM) é um método de suporte não curativo, com indicações específicas, possíveis repercussões hemodinâmicas funcionais e complicações potenciais (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Este tipo de suporte é necessário em pacientes com alterações da função respiratória, que incapacitem a realização das trocas gasosas e fornecimento de oxigênio para a perfusão tecidual e a ocorrência das reações celulares (MELO *et al.*, 2014).

Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é uma infecção pulmonar que ocorre no mínimo de 48 horas após intubação endotraqueal ou traqueostomia, caracterizado por novo infiltrado pulmonar, febre, secreção traqueobrônquica purulenta, leucocitose e declínio na oxigenação e a detecção de um agente patogênico (MOGYORO´ DI *et al.*, 2016). A pneumonia ocorre como uma resposta à invasão por alguns micro-organismos no sistema respiratório inferior e do parênquima pulmonar, uma vez que a intubação compromete a integridade da orofaringe e da traqueia, permitindo que secreções gástricas e orais penetrem nas vias aéreas inferiores (CHARLES *et al.*, 2014).

A PAV representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes de UTI, e está associada diretamente ao tempo de internação (PHILIPPART *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, o índice de mortalidade atribuída a pacientes com PAV nestas unidades é de 15% a 50 % (YOSHIMURA *et al.*, 2017). A prevalência relatada é de 20,5 a 34,4 casos de pneumonia por 1.000 dias de VM e de 3,2 casos por 1.000 dias em pacientes não ventilados e uma variação entre 10% a 50% dos pacientes intubados que podem desenvolver a doença, com risco aproximado de 1% a 3% por dia de intubação endotraqueal (BORK *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2016).

O prognóstico de PAV causada por bacilos Gram-negativos é consideravelmente pior do que as causadas por cocos Gram-positivos (YOSHIMURA *et al.*, 2017). Kollef e

colaboradores (2010) demonstraram que pacientes com PAV por patógenos, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* apresentam uma taxa de mortalidade maior (65%) do que em pacientes com PAV (PRATES *et al.*, 2011; BORK *et al.*, 2015).

2.2. Diagnóstico de PAV

Os critérios diagnósticos de PAV são controversos. Diversas metodologias têm sido descritas na literatura, para propósitos de vigilância epidemiológica e diagnóstico, porém, nenhum conjunto de critérios emergiu como sendo o mais adequado (YOSHIMURA *et al.*, 2017). Apesar de toda a controvérsia, os sinais clínicos, ainda que por vezes inespecíficos, são usados como critérios inicial, além de exames por imagem e culturas bacteriológicas para definição do agente etiológico (PHILIPPART *et al.*, 2015).

Existem diferentes métodos para se obter amostras para o diagnóstico de PAV, que incluem métodos invasivos e não invasivos. Estas amostras podem ser obtidas através de:

- Aspirado endotraqueal: técnica não invasiva, de fácil e rápida obtenção, porém pode apresentar altas taxas de falsos positivos, devido à colonização das vias aéreas (KALANURIA *et al.*, 2014). Em culturas quantitativas é usado um valor de *cut-off* de 10^4 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (ANVISA 2013). Frequentemente são usados como um componente de vigilância microbiológica, para ajustar à terapêutica (SCHOLTE *et al.*, 2014).

- Lavado broncoalveolar: técnica que requer um broncoscópio que permite recuperar, através do uso de um veículo fluído, componentes celulares e não-celulares da superfície epitelial dos bronquíolos e alvéolos, com um *cut-off* de 10^5 UFC/mL (ANVISA 2013). Há algumas complicações associadas com a técnica podendo ocorrer, como hipoxemia, arritmias cardíacas e broncospasmo (CHARLES *et al.*, 2014).

- O mini-lavado broncoalveolar (mini-BAL) representa uma técnica semelhante, porém realizada às cegas, e com um menor volume de fluído, porém com mesmo valor de *cut-off* (ANVISA 2013).

Crescimentos bacterianos em culturas quantitativas com contagens superiores aos pontos de corte citados acima indicam, com maior especificidade, que o micro-organismo isolado está associado com a etiologia da PAV enquanto que contagens inferiores sugerem colonização (PRATES *et al.*, 2011; ANVISA, 2013). Sendo que estas técnicas de bacteriologia empregadas na rotina para a detecção do agente

etiológico de PAV demandam tempo e possuem menor sensibilidade em relação as técnicas moleculares (PELEG *et al.*, 2008). Acredita-se que a otimização de técnicas moleculares no diagnóstico de PAV, especialmente para infecções causadas pelo *A. baumannii* se faz necessária, com potencial de impacto positivo sobre o desfecho clínico dos pacientes.

2.3. Tratamento de PAV

A escolha da terapêutica será baseada na presença de fatores de risco para infecção com micro-organismos multirresistentes e poderá ser, inicialmente, de amplo espectro, necessitando de um descalonamento de acordo com os dados microbiológicos e analíticos/imagem, bem como a evolução clínica do paciente (CHAHOUUD *et al.*, 2015). A duração do tratamento é em média de 7-8 dias, dependendo da gravidade clínica, e dos dados microbiológicos disponíveis, pois micro-organismos como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* têm taxas mais elevadas de recorrência com regimes de antibioticoterapia mais curtos, devendo por esse motivo utilizar-se um regime mais prolongado (10 a 15 dias) (PUGH *et al.*, 2015). Porém o uso prolongado de antimicrobianos de amplo espectro, utilizados para tratar estas infecções, contribui para o aumento dos índices de morbidade, lesão renal e aumento das taxas de seleção de micro-organismos mais resistentes (CHAHOUUD *et al.*, 2015).

3. *Acinetobacter* spp.

O microbiologista holandês Beijerinck foi quem primeiro isolou o micro-organismo em 1911 do solo, denominando-o *Micrococcus calco-aceticus* (BEIJERINCK *et al.*, 1911). Posteriormente, Brisou e Prévot em 1954 agruparam as bactérias estudadas por Beijerinck em um gênero denominado *Achromobacter* (BRISOU & PRÉVOT, 1954). A denominação do gênero para *Acinetobacter* ("akinetos", do grego, não-movéis) foi proposto em 1968 por Paul Baumann, e foi amplamente aceito (BAUMANN *et al.* 1968).

A identificação das várias espécies do gênero *Acinetobacter* é complexa, dada à proximidade das suas características. A distinção entre espécies é realizada, por métodos de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados para tratamento clínico, que nem sempre tem resultados confirmatórios, fenotipagem e biotipagem, cuja complexidade e morosidade, em alguns casos, os tornam impraticáveis na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica (PELEG *et al.*, 2008).

O gênero *Acinetobacter* apresenta-se de forma coco-bacilar na fase estacionária de crescimento em meio não seletivo, Gram-negativo, estritamente aeróbio, imóvel, possuindo de 39% a 47% de moles de conteúdo guanina e citosina (GC) em seu DNA, não fermentador da glicose, catalase positivo e oxidase negativo (PELEG *et al.*, 2008). Este micro-organismo multiplica-se bem a 37 °C em meios de cultura sólidos comumente utilizados em laboratórios clínicos (ágar sangue e MacConkey); as colônias apresentam coloração branca acinzentada, podendo ser mucóides e medem de 1,5 a 3 mm de diâmetro, estando amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em materiais inanimados e reservatórios humanos (ZHENG *et al.*, 2013).

3.1. *Acinetobacter baumannii*

Do ponto de vista clínico, a espécie *A. baumannii* é a de maior relevância do gênero. Até o início da década de 90, era descrita apenas como uma bactéria de origem ambiental envolvida em algumas infecções oportunistas (LIN & LAN, 2014), no entanto é considerada como o maior desafio relacionado a cuidado de saúde do século XXI (KROGER *et al.*, 2017). Estima-se que nos Estados Unidos *A. baumannii* já seja responsável por 10% de todas as infecções nosocomiais e cerca de 20% das infecções no mundo, quando estes pacientes estão internados em centros ou unidades de terapia intensiva (KROGER *et al.*, 2017).

Acinetobacter baumannii pode estar envolvido em uma variedade de infecções como de corrente sanguínea, pele, trato urinário, endocardite, meningites secundária e principalmente, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (ZHENG *et al.*, 2013; MORANDI *et al.*, 2015). A taxa de mortalidade em pacientes infectados por *A. baumannii* pode atingir 35% (ANTUNES *et al.*, 2014).

Essa bactéria pode sobreviver em locais secos, como chão, equipamento de radiografia, colchões, mesas, luvas, termômetros, travesseiros, materiais de fórmica e prontuários, por média de seis dias (ANVISA, 2008; CHAGAS *et al.*, 2011). Apresenta alto grau de hidrofobicidade, com capacidade de aderir a plásticos, inclusive a superfícies de catéteres, tubos endotraqueais e diversos outros biomateriais (ESPINAL *et al.*, 2012). Esta habilidade de sobrevivência está provavelmente ligada ao fato dessa bactéria crescer em diferentes temperaturas e pH variáveis, e suportar/tolerar ambientes com escassez de nutriente (AHMED *et al.*, 2015).

Em seres humanos, esta bactéria pode colonizar a pele, os tratos respiratórios e gastrintestinal, assim como feridas (FOURNIER *et al.*, 2006). Altas taxas de

colonização da pele e dos tratos respiratório e digestivo têm sido observadas durante os surtos, sendo a orofaringe um dos sítios predominantes de colonização por *A. baumannii* em pacientes hospitalizados, pois as mucinas presentes na cavidade oral são o primeiro sítio de ligação do micro-organismo e podem funcionar como receptores de aderência bacteriana para esta espécie (VASHISTT *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017).

3.2. Fatores de patogenicidade intrínseca.

Estudos de análises genômicas e fenotípicas de *A. baumannii* tem identificado vários fatores de virulência responsáveis pela sua patogenicidade, demonstrando como os mecanismos intrínsecos e adquiridos fazem desta bactéria um grande desafio dos cuidados relacionados à saúde (LEE *et al.*, 2017).

3.2.1. Porinas

As porinas são proteínas da membrana externa associadas à modulação da permeabilidade celular, sendo a OmpA a porina mais abundantemente encontrada na membrana externa em *A. baumannii* (McCONNELL *et al.*, 2013). A OmpA tem capacidade de se ligar a células epiteliais do hospedeiro liberando moléculas proapoptóticas como o Citocromo C, induzindo a apoptose (LEE *et al.*, 2017). Esta porina desempenha um papel importante na adesão e na invasão de células epiteliais através da interação com a fibronectina (SMANI *et al.*, 2012). Além disso, também esta envolvida na resistência com a expulsão de antimicrobianos como cloranfenicol, aztreonam e ácido nalidíxico (LEE *et al.*, 2017) e contribui para a permanência da bactéria, facilitando a motilidade e formação de biofilmes (McCONNELL *et al.*, 2013).

3.2.2. Vesículas de membrana externa (OMVs)

As vesículas de membrana externa são vesículas esféricas medindo aproximadamente de 20-200nm de diâmetro, presentes em várias bactérias Gram-negativas (KULP & KUEHN, 2010). São reconhecidas como um mecanismo de entrega de diversos fatores de virulência para o interior das células hospedeiras (JUN *et al.*, 2013). Vários estudos demonstram a utilização deste mecanismo por linhagens de *A. baumannii*, secretando as OMVs contendo vários fatores de virulência, incluindo a OmpA (JIN *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2012), proteases e fosfolipases (KWON *et al.*, 2009).

Estudo realizado por Kwon e colaboradores (2009), demonstrou que além das OMVs serem um excelente mecanismo de carreamento de fatores de virulência, participam

também na propagação de genes de resistência a antimicrobianos, induzindo a transferência horizontal de genes, como ficou evidenciado no estudo, no qual linhagens de *A. baumannii* que não expressavam o gene *bla*_{OXA-24}, responsável por conferir a bactéria maior resistência aos carbapenêmicos, passaram a expressar o gene, após serem adicionados a um meio contendo OMVs que carreavam o gene.

3.2.3. Formação de Biofilme

A formação de biofilmes por bactérias patogênicas é um desafio nos cuidados de saúde, pois formação do biofilme as torna mais resistentes aos antimicrobianos, reduzem a eficácia dos esforços de descontaminação e aumenta a persistência de bactérias em dispositivos abióticos, além de desempenhar um papel importante na evasão imunológica por *A. baumannii*, fazendo uso dos *pili* que são essenciais para a aderência e a formação de biofilme (RUSSO *et al.*, 2016).

3.3. Mecanismos de resistência adquiridos

3.3.1. Produção de β -lactamases

Linhagens de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos têm sido isoladas com frequência, sendo a produção de β -lactamases o principal mecanismo de resistência da espécie (LEE *et al.*, 2017). As resistências intrínsecas à benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina e piperacilina são mediadas pela β -lactamase de classe D de Ambler, OXA-51-like (JEON *et al.*, 2016). Outras enzimas produzidas naturalmente por essa espécie são as cefalosporinas cromossomais não induzíveis do tipo AmpC, também chamadas *Acinetobacter derived cephalosporinases* (ADCs) que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro ou restrito, dependendo da variante (TIAN *et al.*, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado que *A. baumannii* tem competência natural de adquirir genes de resistência através da transferência horizontal de genes, que explicam sua alta capacidade de resistência a antimicrobianos (TRAGLIA *et al.*, 2016).

A classe A de *Ambler* representa o maior grupo de β -lactamases estudado, e geralmente são inibidas por inibidores de β -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e a monobactâmicos, podendo conferir resistência em baixos níveis aos carbapenêmicos, com exceção de algumas enzimas do tipo KPC (JEON *et al.*, 2016).

A classe A de β -lactamases que foram identificados em *A. baumannii*, são: TEM,

SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC e CARB, sendo TEM-1, CARB-4 e SCO-1, são de espectro restrito, enquanto outras enzimas (por exemplo, PER-1, TEM-92, CARB-10, SHV-5, PER-2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 e PER-7) são β -lactamases de espectro estendido (ES β LS) (LEE *et al.*, 2017). Essas enzimas apresentam serina no seu sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídios. Geralmente, são inibidas por inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam e, conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, podendo também conferir resistência aos carbapenêmicos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 2008).

A classe B β -lactamases de Ambler são as Metallo- β -lactamases (MBLs), uma das principais enzimas relacionadas com a redução da sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e têm sido descritas em amostras de *Acinetobacter* spp. desde o início da década de 90 (POIREL *et al.*, 2000). Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como cofator para atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes (JEON *et al.*, 2016). Uma variedade das β -lactamases da classe B foram identificadas em *A. baumannii* como IMP, VIM, SPM, SIM, DIM, KHM e NDM (TOLEMAN *et al.*, 2002; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; JACOBY; MUNOZ- PRICE, 2005; LEE *et al.*, 2005; YONG *et al.*, 2007; SEKIGUSHI *et al.*, 2008; YONG *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2010; BUSH, 2010).

A classe C de Ambler, engloba a produção de β -lactamases do tipo AmpC e são enzimas cromossômicas que geralmente conferem resistência às penicilinas, inclusive às associações com inibidores de β -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A resistência às oximino-cefalosporinas devido à produção desta enzima é também uma característica comum em *A. baumannii* (WOODFORD *et al.*, 2006). O aumento da expressão do gene *AmpC* é regulado pela sequência promotora denominada ISAbal (CORVEC *et al.*, 2003; HERITIER; POIREL; NORDMANN, 2006; JACOBY, 2009). Esta sequência de inserção é um elemento genético bastante disseminado entre amostras de *A. baumannii* e possui um sítio ativo promotor bastante eficiente para a produção de *Open Reading Frames* (ORFs) adjacentes (CORVEC *et al.*, 2003; WOODFORD, 2006).

As classes D de Ambler, as oxacilinasases (OXA), são enzimas que apresentam o agrupamento serina no seu sítio ativo, inativam principalmente os antimicrobianos

carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como a cefepima; no entanto não há ação hidrolítica quando o substrato é a ceftazidima (BOU *et al.*, 2000; BROWN; AMYES, 2006; WATSON *et al.*, 2009). O primeiro relato de uma serino-beta-lactamase capaz de hidrolisar o imipenem em *A. baumannii* ocorreu em 1993, na Escócia e foi denominada OXA-23 (PATON *et al.*, 1993). A habilidade de OXA-23 em hidrolisar os carbapenêmicos permitiu a definição de um novo grupo de enzimas do tipo OXA, com atividade de carbapenemases, este grupo foi nomeado *Carbapenem-Hydrolysing class D enzymes* - CHDLs (POIREL e NORDMANN, 2006). As CHDLs, carbapenemases mais frequentes em *A. baumannii*, não hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos é 100 a 1000 vezes menor quando comparadas às MβLs. Estas estão divididas em cinco grupos filogenéticos de acordo com a homologia de sua sequência de aminoácidos assim nomeados: *bla*_{OXA-23} like, *bla*_{OXA-51} like, *bla*_{OXA-58} like, *bla*_{OXA24-40} like, e *bla*_{OXA-143} like (POIREL *et al.*, 2010). O gene *bla*_{OXA-51}-like, intrínseco de *A. baumannii* confere resistência aos carbapenêmicos somente quando associado a elementos de inserção tipo *ISAbal* ou *ISAbag*, localizados *upstream* ao gene, agindo como forte promotor transcricional (TURTON *et al.*, 2006). Até o momento este gene *bla*_{OXA-51}-like é utilizado para a identificação desta espécie bacteriana (ALKASABY *et al.*, 2017). No entanto, Lee e colaboradores (2012) questionaram o uso do *bla*_{OXA-51}-like como um marcador espécie específico, relatando terem encontrado o marcador em outras espécies dentro do gênero *Acinetobacter* spp.

A enzima OXA-143 está em um subgrupo distinto, possui atividade contra penicilinas e carbapenêmicos e foi detectada pela primeira vez no Brasil em 2004 por Higgins e colaboradores (2009). E até o presente momento, só há relato da presença deste gene dentro do território brasileiro (CAMARGO *et al.*, 2015, MOREIRA *et al.*, 2017).

3.3.2. Produção de enzimas inativadoras de Aminoglicosídeos

As aminoglicosidases são enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e podem ser classificadas em acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases. Atuam diminuindo a sua afinidade de ligação às unidades ribossômicas do RNA das bactérias (ZAVASCKI *et al.*, 2010) e representam o mecanismo de resistência de *A. baumannii* a antimicrobianos desta classe. Essas enzimas são codificadas por genes que estão associados aos integrons de classe 1 (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; NEMEC *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017). Essa classe de antimicrobianos possui vários agentes como a gentamicina,

amicacina, tobramicina, estreptomicina, neomicina, canamicina, entre outros. Dentre estes, amicacina, gentamicina e tobramicina são os mais prescritos, e a indicação clínica mais comum é no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos aeróbios, tais como em infecções por *A. baumannii* (BASSETTI *et al.*, 2013).

3.3.3. Resistência aos carbapenêmicos

Estes incluem imipenem, meropenem e doripenem, inicialmente considerados como agentes promissores para infecções por *A. baumannii*, devido à sua atividade efetiva contra esse micro-organismo e seus baixos efeitos citotóxicos (DOI *et al.*, 2013). Por este motivo houve um uso crescente dos carbapenêmicos no ambiente hospitalar que vem exercendo uma pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, o que pode estar ocasionando um aumento nos níveis de resistência de algumas bactérias como *A. baumannii* a esses antimicrobianos. Dentre os mecanismos mais prováveis de resistência encontram-se a redução da permeabilidade da membrana externa causada pela perda ou expressão reduzida de porinas, hiperexpressão de bombas de efluxo e, menos frequentemente, alteração nas PBPs (proteínas ligantes de penicilinas) (POIREL *et al.*, 2010; HOWARD *et al.* 2012).

Atualmente, várias linhagens de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos têm sido relatadas, limitando o tratamento destas infecções a poucos antimicrobianos, levando aos clínicos e pesquisadoras a explorem abordagens terapêuticas alternativas como a volta do uso dos antimicrobianos Tigeciclina e Polimixinas (LEE *et al.*, 2017).

3.3.4. Resistência às Polimixinas

Polimixinas são antimicrobianos peptídicos com atuação na membrana externa e citoplasmática das bactérias, conduzindo à perda da integridade dessas estruturas. A polimixina B e a polimixina E (colistina-COL) são as mais adequadas para uso clínico e têm sido utilizadas como o "último recurso" no tratamento de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes (OLAITAN *et al.*, 2014). Por um longo período, as polimixinas foram pouco utilizadas devido a preocupações relativas à sua toxicidade renal e pela pouca disponibilidade dessa droga no mercado nacional. No entanto, nos últimos cinco anos a emergência de bactérias Gram-negativas multirresistentes e a falta de opções terapêuticas têm levado à sua reutilização rotineira (LEAN *et al.*, 2014).

Recentemente, algumas linhagens de *A. baumannii* têm apresentado resistência crescente à Polimixina B, com a presença de algumas mutações encontradas em genes que codificam glicosiltransferases únicas nos genes *lpxC* e *lpxD*, e de genes que

participam na remodelação da membrana celular (HOOD *et al.*, 2013; LEAN *et al.*, 2014). O surgimento da resistência à colistina em linhagens de *A. baumannii*, deve-se a mecanismos que incluem remodelação e perda de LPS, com mutações em dois componentes de membrana em *pmrA* e *pmrB* que ativam *pmrC*, relacionados com a modificação do lipídio A da membrana plasmática, com a perda ou deficiência na produção de lipopolissacarídeo, tornando estas linhagens pan-droga resistentes (resistentes a todas as classes de antimicrobianos) (CAI *et al.*, 2012; MÚNERA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2017).

4. Técnicas de Biologia Molecular

A biologia molecular é a área da ciência que envolve o estudo e a manipulação das moléculas que constituem o material genético dos indivíduos. Desde o século passado, inúmeros avanços foram obtidos, tais como a identificação da estrutura e da função do ácido desoxirribonucléico (DNA) e o desenvolvimento de novas técnicas que permitiram o isolamento, a manipulação, a multiplicação e o sequenciamento do DNA, proporcionando com isso grandes avanços em diversas áreas como: medicina forense, genética, sequenciamento do genoma humano e microbiano e diagnóstico de doenças infecciosas (WATSON *et al.*, 2009).

A grande vantagem de técnicas de análises moleculares é sua capacidade de fornecer, em poucas horas, um resultado de alta sensibilidade e especificidade. O emprego desta metodologia na área da microbiologia permite a detecção simultânea de genes de resistência aos antimicrobianos e a identificação do micro-organismo em um intervalo de tempo muito menor, quando comparado com o método tradicional de cultura bacteriana, utilizado na rotina de laboratórios clínicos (NEMEC *et al.*, 2011).

4.1. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

A hibridização *in situ* com sondas fluorescentes, FISH, é um método que permite a quantificação de micro-organismos sem a necessidade de cultivá-los. O método permite identificar por microscopia, micro-organismos presentes em diversos ambientes, tendo por base o uso de sondas (pequenas sequências complementares ao RNAr 5S, 16S, 23S ou complementares ao RNAm) marcadas com compostos fluorescentes ou por fluorocromos (PELEG *et al.*, 2009). Seu uso consiste no mesmo princípio da “impressão digital”, uma vez que os organismos podem ser identificados dentre uma população mista, por apresentarem uma região complementar à sonda a ser utilizada (AMANN *et al.*, 1995).

O emprego de FISH geralmente envolve quatro etapas básicas que são: i) a fixação do espécime clínico; ii) a montagem da lâmina; iii) a hibridização com a sonda específica do micro-organismo pesquisado; iv) a coloração com o 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e observação sob microscopia de fluorescência (PELEG *et al.*, 2008).

4.1.2. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

A técnica de LAMP, descrita por Notomi e colaboradores (2000), é um método de biologia molecular que permite amplificar poucas cópias de DNA até uma quantidade próxima a 10^9 em menos de uma hora, sob condições isotérmicas, e com grande especificidade. A técnica baseia-se na utilização de uma DNA polimerase com atividade de liberação das cadeias formadas e temperatura ótima de atividade entre 60° e 65 °C. Esta técnica emprega além de uma enzima a DNA polimerase (*Bst*) um conjunto de quatro a seis iniciadores especialmente desenhados para reconhecer um total de seis sequências distintas no DNA alvo, sendo estes iniciadores desenhados utilizando-se o software http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html (NAGAMINE *et al.*, 2001).

A técnica de LAMP apresenta como vantagens; (i) o fato de amplificar DNA em condições isotérmicas e partindo de poucas cópias, como acontece na PCR (ii) devido à necessidade de reconhecimento de seis pontos de anelamento para os iniciadores, a técnica é altamente específica (iii) a técnica é simples e fácil de ser executada podendo ser realizada sem a presença de um termociclador, usando para execução em banho seco: (iv) o resultado qualitativo pode ser visualizado com adição de intercalantes como *SYBR® Green*, ou corantes como *Hidroxinaftol Blue* ou gel de eletroforese em agarose (NOTOMI *et al.*, 2000).

4.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de 1º, 2º e 3º geração.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) representa a técnica mais utilizada no diagnóstico molecular de micro-organismos, pois possui a capacidade de replicação de DNA, mesmo que este em pequenas quantidades que pode ser repetido em larga escala (MACKAY *et al.*, 2004). A metodologia requer em primeiro lugar, a identificação de pelo menos parte do DNA alvo, com auxílio de iniciadores ou sondas, que hibridizam especificamente com a sequência alvo (LEE *et al.*, 2001). Embora a PCR dita como convencional ou de 1º geração possua alta sensibilidade e especificidade, apresenta algumas limitações, incluindo a exigência de uma corrida eletroforética em gel de agarose, falta de capacidade quantitativa e a utilização de reagentes tais como o brometo de etídio, que é prejudicial para a saúde do operador (LEE *et al.*, 2008).

A PCR em tempo real (qPCR) ou PCR de 2º geração foi desenvolvida em 1992, como um aperfeiçoamento da PCR original criada por Kary Mullis e representa um avanço significativo da biotecnologia para o diagnóstico de doenças infecciosas (YONG *et al.*, 2009). O sistema baseia-se na utilização de corantes fluorescentes *SYBR® Green* ou sondas *TaqMan®*, que permitem o monitoramento do produto amplificado em tempo real. (STRUELENS *et al.*, 2010). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal que cria um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da qPCR (*Ct*), e o sinal gerado reflete a quantidade de produto formado. Estas características da qPCR permitem a eliminação de uma fase de pós-amplificação trabalhosa (preparação de eletroforese em gel), convencionalmente necessária para a observação do produto amplificado. Assim, os benefícios de qPCR em relação à PCR convencional são numerosas e incluem a velocidade, reprodutibilidade e a capacidade quantitativa (STRUELENS *et al.*, 2010).

A PCR *droplet* digital (ddPCR) ou de 3º geração assume uma abordagem fundamentalmente diferente para quantificar o número de moléculas de DNA em uma amostra. Como na qPCR, os corantes fluorescentes estão incluídos na reação de amplificação de DNA, no entanto, ao contrário da qPCR, a quantificação é alcançada sem a necessidade da construção de uma curva padrão e seus valores de quantificação medidos através de *Ct*. Ao invés disso, a solução contendo os iniciadores (*primers*), o Master mix, o DNA e a água são divididas em milhares de partes independentes, através de capilares e emulsão de óleo usando micropoços e o equipamento destinado à técnica. Isso proporciona com que nesta mistura aconteça uma reação individual (KUYPERS *et al.* 2017). Com base no número de partições positivas (que emitem fluorescência) e negativas, o número de cópias alvo na amostra poderá ser calculado (VYNCK *et al.*, 2016).

5. Métodos de tipagem molecular

Os métodos de tipagem molecular são necessários para avaliar se as linhagens de micro-organismos são epidemiologicamente relacionadas ou não. Em geral, linhagens com 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis, enquanto que aquelas com mais de 80% de similaridade genética são consideradas relacionadas e as com menos que 80% são consideradas distintas (SINGH *et al.*, 2006; SADER *et al.*, 2005; PELEG *et al.*, 2008).

As metodologias de tipagem molecular que se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para realização de discriminação entre as linhagens, são as mais utilizadas atualmente. As técnicas frequentemente usadas em

laboratórios para estudo da epidemiologia molecular da resistência e estudos de genética de população bacteriana incluindo-se *A. baumannii* são o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e a tipagem baseada em *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

A técnica de PFGE é provavelmente a técnica de DNA *fingerprinting* mais utilizada para tipagem de uma variedade de bactérias. Consiste no aprisionamento do DNA total das linhagens em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição e separação dos fragmentos por eletroforese de campo pulsado, sendo considerada padrão-ouro, por apresentar alto poder discriminatório (SCHWARTZ *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2006). Ela auxilia na investigação epidemiológica dos surtos como também, para definir a relação genética entre amostras provenientes de diferentes cidades e países, pois estabelece um grau de similaridade entre estas (SCHWARTZ *et al.*, 2006; NEMEC *et al.*, 2011; VAN DEN BROEK *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2006; LANDMAN *et al.*, 2009). A análise do perfil das bandas geradas na eletroforese é realizada pela aquisição da imagem com posterior comparação dos perfis obtidos em “softwares” especializados, que permitem a análise de um grande número de amostras bacterianas e armazenagem em um banco de dados para análises posteriores através da construção de um dendograma (TENOVER *et al.*, 1995; REMENTERIA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2014).

Multilocus Sequence Typing (MLST) é um método de tipagem altamente discriminatório que tem sido aplicado no estudo de uma variedade de patógenos bacterianos (ENRIGHT *et al.*, 2000). Atualmente, MLST possui uma biblioteca de tipagem para estudos epidemiológicos de *A. baumannii*, que poderá auxiliar na compreensão da evolução de estirpes endêmicas e epidêmicas (VALI *et al.*, 2015). A metodologia se baseia na amplificação de sete genes conservados do genoma, seguido de sequenciamento dos mesmos. Para *A. baumannii* existem dois esquemas distintos de análise do MLST, que foram chamados de MLST-OD (relacionado ao banco de dados Oxford) e MLST-IP (desenvolvido pelo Instituto Pasteur). Pelo esquema de MLST-OD, os sete genes conservados (*housekeeping*) usados são *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* e *rpoD* e pelo esquema do MLST-IP os sete genes usados são *gltA*, *recA*, *cpn60*, *fusA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB* (BARTUAL *et al.*, 2005; NEMEC *et al.*, 2008). Cada um dos genes é sequenciado e a sequência obtida é comparada com as já existentes nos bancos de dados. Para cada sequência diferente de cada gene é dado um número de alelo único (*allele number*). O número de alelo é fornecido para cada um dos sete genes. Assim, a combinação de todos os números de alelos gera o *Sequence Type* (ST), que pode ser

comparado com os *STs* já descritos no banco de dados disponível no site
[http://www.pubmlst.org/a.baumannii\(MLST-OD\)](http://www.pubmlst.org/a.baumannii(MLST-OD)) e
[http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/abaumannii.html\(MLST-IP\)](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/abaumannii.html(MLST-IP)).

6. *Justificativa*

A crescente prevalência, bem como a notável capacidade de resistência, intrínseca ou adquirida, à maioria dos antimicrobianos utilizados na prática clínica observada em amostras de *A. baumannii*, torna as infecções envolvendo este micro-organismo um grave problema de saúde pública na atualidade. *A. baumannii* associa-se intimamente a diferentes tipos de infecções, notadamente à PAV, aumentando a morbidade e a mortalidade dos pacientes, especialmente daqueles internados em Centro de Terapia Intensiva. O diagnóstico é controverso, inicialmente se baseia nos sinais clínicos do paciente e na identificação do agente etiológico por meio de cultivo microbiológico, cujo resultado levará aproximadamente 72 horas para que haja uma identificação conclusiva. Diante disso estes pacientes são submetidos a tratamentos empíricos com esquemas antimicrobianos complexos, tóxicos, de alto custo e de amplo espectro. Este tipo de tratamento contribui para aumento dos custos, aumento dos efeitos adversos advindos desses fármacos, e exerce uma pressão seletiva o que favorece o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Portanto a otimização do diagnóstico de PAV se faz necessário, influenciará diretamente no prognóstico destes pacientes contribuindo para uma diminuição no tempo de internação, tratamento e descaleamento melhor direcionado.

Dessa forma, este projeto buscou contribuir na avaliação de métodos moleculares na detecção de *Acinetobacter baumannii*, visando à otimização do diagnóstico e a uma futura implantação destes na rotina laboratorial.

7. Objetivos

7.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de métodos moleculares no diagnóstico laboratorial de *Acinetobacter baumannii* em amostras de mini-lavado broncoalveolar (mini-BAL) obtidas em pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV).

7.2. Objetivos específicos

- Isolar, identificar e determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, das amostras de *Acinetobacter baumannii* obtidas em mini-BAL de pacientes com suspeita de PAV, empregando-se métodos fenotípicos;
- Avaliar a detecção de *A. baumannii* a partir de colônias isoladas e diretamente do mini-BAL, empregando-se a técnica de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH);
- Padronizar as condições de detecção e identificação de *A. baumannii* a partir de colônias isoladas e diretamente do mini-BAL empregando-se a técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP).
- Detectar a presença de genes codificadores das β -lactamases: oxacilinasas, metalo- β -lactamases e serino- β -lactamases a partir de colônias isoladas e diretamente do mini-BAL, empregando-se a técnica de LAMP e comparar o desempenho da técnica de LAMP com a técnica de referência, PCR convencional.
- Avaliar a presença de *A. baumannii* diretamente do mini-BAL por metodologia quantitativa de PCR convencional, em tempo real (qPCR) metodologia de *SYBR*[®] *Green* e *TaqMan*[®] e droplet digital (ddPCR) e comparar a sensibilidade e especificidade entre elas.

8. *Material e métodos*

Os pacientes foram incluídos no estudo após aceitarem participar do mesmo, e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Aqueles que não apresentaram condições clínicas para decidir acerca da sua participação (ex., pacientes em coma e/ou sedados), tiveram o TCLE assinado por um familiar ou responsável.

Dados demográficos e clínicos foram obtidas de todos os pacientes incluídos no estudo mediante utilização de questionário especialmente desenvolvido para este projeto. As seguintes variáveis clínicas foram consideradas:

- Diagnóstico principal na internação no Centro de Terapia Intensiva (CTI)
- Comorbidades apresentadas;
- Dados de ventilação mecânica;
- Escores de gravidade à admissão no CTI (APACHE II, SAPS 3 e SOFA);
- Uso de amins vasoativas durante a internação;
- Uso de antimicrobianos, com especificação das drogas utilizadas;
- Resultado microbiológico de aspirado traqueal;
- Resultado microbiológico de amostra clínica obtida por *Swab* na entrada hospitalar ou como esquema de vigilância;
- Desfecho clínico dos pacientes.

Critérios de inclusão no estudo:

- Idade \geq 18 anos;
- Internação há pelo menos 48 horas;
- Suspeita de PAV pela equipe assistente, com decisão de iniciar terapia antimicrobiana (ver critérios de PAV, abaixo);
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável .

Critérios de não inclusão no estudo:

- Presença de contraindicação à realização do mini-BAL, quais sejam:
- *i*) hipoxemia (necessidade de $FiO_2 > 70\%$, com PEEP > 10 , para manter $SatO_2 > 90\%$;
- *ii*) instabilidade hemodinâmica grave, com dosagem de noradrenalina $> 20\text{mL/h}$, na diluição padrão (20mg/200mL).

Por se tratar de estudo de observação, não houve nenhuma alteração propedêutica ou terapêutica na condução dos pacientes pela equipe médica, que seja decorrente deste estudo.

Definições:

- **Diagnóstico confirmado de PAV:** Definido como infiltrado novo ou progressão de um infiltrado previamente existente na radiografia de tórax, associado a pelo menos um dos seguintes (temperatura axilar ≥ 38.3 °C e leucócitos totais $\geq 10^9/l$) e pelo menos um dos seguintes (aspiração de escarro purulento pelo tubo orotraquial (TOT) ou traqueostomia; piora da troca gasosa, com queda da saturação periférica de oxigênio [ex., $PaO_2/FiO_2 < 300$], aumento da demanda de oxigênio suplementar, ou aumento da demanda ventilatória), mais de uma cultura de mini-BAL mostrando contagem $\geq 10^5$ UFC/mL (ANVISA 2013).

- **Diagnóstico suspeito de PAV ou colonização das vias aéreas:** A mesma definição acima, porém com cultura de mini-BAL negativa, ou com contagem $< 10^4$ UFC/mL.

8.1. Obtenção dos espécimes clínicos, identificação fenotípica e testes de susceptibilidade a antimicrobianos

8.1.1. Coleta do mini-Lavado broncoalveolar (mini-BAL)

As amostras de mini-BAL foram coletadas pela equipe de fisioterapia do Centro de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital das Clínicas/UFMG, conforme protocolos bem estabelecidos pelos mesmos. Durante os procedimentos, administraram-se 100% de oxigênio, mantendo o paciente monitorado e sob sedação conforme critério médico. Para a coleta do espécime clínico, um cateter conectado a um *three-way* foi preparado e por meio deste, uma seringa com soro fisiológico foi acoplado a um circuito fechado de coleta estéril, “bronquinho”. Foi introduzido o cateter às cegas na árvore brônquica e instilando aproximadamente 30 mL de solução fisiológica 0,9% (SF 0,9%) estéril, sendo este conteúdo imediatamente aspirado. Quando, pelo menos 10mL de fluido foi aspirado, o cateter inteiro foi removido. Caso contrário sem a retirada do mesmo este foi posicionado o mais distal possível e novamente, e instilado mais 15mL de SF 0,9% em seguida, máximo de volume possível foi aspirado. Com os espécimes, devidamente

vedadas e identificadas, foram encaminhados ao laboratório de biologia Oral e anaeróbios (MOA), do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas à temperatura ambiente no máximo em quatro horas.

8.1.2. Cultura quantitativa do mini-BAL

Cada amostra de mini-BAL obtidas foi homogeneizada e dividida em cinco alíquotas de aproximadamente 2mL em tubos do tipo *Eppendorf* no laboratório (MOA), onde foram submetidas ao seguinte processamento pareado:

1^a amostra

- Foi realizada a análise microscópica direta através de um esfregaço, corada pela técnica de Gram.

- A mesma alíquota foi usada para semeadura primária em meios de cultura *Tryptone Soya Agar* (TSA-OXOID[®]), para recuperação de todos os micro-organismos e *MacConkey* (OXOID[®]) para isolamento de micro-organismos Gram-negativos. Com o auxílio de uma alça calibrada de 1µl e após homogeneização, os espécimes foram semeados em placas com os meios de cultura mencionados. Após a semeadura primária, procedeu-se a incubação em estufa a 37 °C por 18-24 horas. As placas foram avaliadas quanto ao crescimento bacteriano, morfologia e contagem do número de unidades formadoras de colônia. Sabendo-se que o valor de corte mais aceito na literatura é o de 10⁴ UFC/mL, a contagem pode ser traduzida da seguinte forma.

- < 10 colônias por placa → < 10⁴ UFC/mL e, supõe-se, colonização.
- ≥ 10 colônias por placa → ≥ 10⁴ UFC/mL e deve ser interpretado como doença infecciosa.

- Foi realizado coloração de Gram de todas as colônias isoladas nas semeaduras primárias e dos novos repiques, a fim de se comprovar a pureza das bactérias isoladas.

Para a identificação da(s) bactéria(s) e levedura (s) isolada(s) crescidas em semeadura, foi utilizado o sistema VITEK[®] II (BioMérieux[®]) por meio de cartões (GN para Gram-negativas, GP para as Gram-positivas e *Yeast* para as leveduras do Test kit VITEK II) segundo as instruções do fabricante.

Após a identificação pelo VITEK[®] II, três alçadas dos inóculos foram preservadas em criotubos contendo 1mL de Caldo Brucella (OXOID[®]) acrescido de 10% de Glicerol estéril e armazenadas em freezer -80 °C.

2^a e 3^a amostras

- Foram utilizadas para as análises de LAMP, FISH, qPCR e ddPCR.

4^a e 5^a amostras

- Duas alíquota de 2mL foram armazenadas em freezer -80 °C, para eventuais necessidades e novas análises quando estas se fizerem necessárias.

8.2. Determinação dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos

Uma alíquota de amostras bacterianas foram retiradas do crescimento (TSA e MacConkey), e testadas quanto à sua susceptibilidade a antimicrobianos pelo sistema automatizado VITEK[®] II (BioMérieux[®]) utilizando os seguintes cartões: para as bactérias Gram-negativas o AST-N239, para as Gram-positivas AST-P585, seguindo as orientações do fabricante.

A metodologia de gradiente de antimicrobianos utilizando a fita plástica (Etest BioMérieux[®]), para a Polimixina B foi testada.

8.3. Aplicação da técnica de Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

8.3.1. Etapa de fixação dos espécimes clínicos

O processo de fixação dos espécimes clínicos de mini-BAL foi realizado no dia da coleta, com o objetivo de preservar a integridade celular.

Este processo consistiu das seguintes etapas: 2mL do mini-BAL e 2mL de solução contendo paraformaldeído 4% e (NaOH 1N pH 8). Esta solução fixadora foi deixada em repouso “*overnight*” a 4 °C. Em seguida este material foi centrifugado a 7.600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado; o *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de PBS 1X, este processo foi repetido por mais duas vezes. Ao final o *pellet* foi ressuspensionado em PBS 1X e adicionado Etanol 100% gelado na proporção 1:1 e armazenado a -20 °C (LEMARCHAND *et al.*,2005).

8.3.2. Etapas de hibridização das células

Os espécimes pré-fixados foram aplicados na superfície da lâmina de teflon

contendo 10 pocinhos de 8mm de diâmetro (*MP Biomedicals*) acrescidos das sondas específica para a bactéria *Acinetobacter baumannii* (ABA1212) e da universal para o Domínio *Bacteria* (EUB338). A especificidade *in situ* das sondas foi checada em pelo programa *National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment*

Search Tool (NCBI/BLAST) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

O protocolo de hibridização dos espécimes clínicos foi proposto por Hahn (2001). Foi aplicado 1µl de amostra no pocinho e espalhado com auxílio de uma ponteira, esta foi levada para uma estufa para secagem a 46 °C por 40 minutos. Em seguida as lâminas foram emersas em solução de Etanol em concentrações de 50%, 80% e 100% com objetivo de promover desidratação das células aderidas à lâmina por imersão serial, após este processo as mesmas foram deixadas à temperatura ambiente.

Foi adicionado em cada pocinho 9µl de tampão de hibridização (0,9 M NaCl, 20 mM Tris.HCl [pH 8,0] 0,01% SDS e formamida, aquecido à 48 °C) contendo formamida na concentração de 35% para sonda EUB338 (5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'') (AMANN *et al.*, 1990). Em seguida 1µl da sonda ABA1212 (5'- GCTTCTCAACACACCTTC- 3') (ZIMMERMANN *et al.*, 2001) foi espalhado no mesmo pocinho com auxílio de uma ponteira, a lâmina foi incubada em câmara escura em estufa a 45 °C por duas horas. Após este período as lâminas foram imersas em tampão de lavagem por 20 minutos a 48 °C em banho-maria. Em seguida as lâminas foram mergulhadas em água ultra pura por 10 segundos para remover sais e SDS e deixadas temperatura ambiente na ausência de luz para secar. Posteriormente foi adicionado em cada pocinho 9µl de água ultra pura e 2µl do corante DAPI (4,6-diamidino-2-phenilindol-DAPI), Sigma® a 0,001%, deixando agir por 10 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após secagem a lâmina foi mergulhada em água destilada e deixada em temperatura ambiente. Posteriormente foi aplicado em cada pocinho 6µl de uma solução contendo (glicerol a 80%, PBS 1X a 20%), as lâminas foram acondicionadas na ausência de luz e sob refrigeração para posterior análise em microscópio.

As lâminas foram examinadas sob microscopia óptica (Olympus BX-50) com objetiva de imersão, para aumento de 1.000 vezes, sob epifluorescência e contraste de fase. A microscopia de contraste de fase foi utilizada somente para ajustar o foco da imagem, antes da observação sob a luz ultravioleta. Foram utilizados filtros específicos com espectro de absorção entre 510 a 550nm e de 330 a 385nm para captação de emissões de fluorescência da sonda e do DAPI, respectivamente (ABREU, 2006).

8.3.3. Quantificação das bactérias

A contagem das bactérias foi realizada em 10 campos microscópicos, em uma primeira etapa as células foram contadas *in loco*, por meio da visualização direta das células através da ocular do microscópio. Posteriormente a contagem foi realizada por um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio, onde as imagens eram capturadas e a contagem das células foi realizada pela sua visualização no monitor do computador.

8.4. Análises por Amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP)

8.4.1. Extração do DNA por lise térmica

Todas as amostras bacterianas isoladas a partir do mini-BAL que estavam em meio de criopreservação a -80 °C foram ressuspensas em meio TSA e incubadas em estufa por 18-24 horas a 35 °C. Posteriormente três alçadas de cada crescimento bacteriano foi homogeneizadas em 200µl de PBS 1% e centrifugadas sob-refrigeração a 4° C a 6.500 rpm por seis minutos, o sobrenadante foi descartado, sendo este procedimento repetido por duas vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensado em 200µl de tampão TE (Tris-HCl10 mM, pH 8,0; EDTA, 1mM) homogeneizado e levado para fervura por 10 minutos, em seguida os tubos foram centrifugados sob refrigeração a 4° C por 10 minutos à 6500 rpm. O produto foi dosado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop[®]).

8.4.2. Desenho dos iniciadores utilizados na reação de LAMP

O desenho de todos os iniciadores utilizados nos ensaios de LAMP foram desenhados a partir do programa http://primerexplorer.jp/e/v3_manual/index.html (NAGAMINE *et al.*, 2001; NOTOMI *et al.*, 2000). Os seguintes genes foram avaliados neste estudo: *bla*_{Oxa51} e região ITS ambos usados para detecção e identificação de *A. baumannii*, os genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2}, para detecção de Beta- lactamases (Tabela 1).

Todas os iniciadores foram verificados quanto à especificidade *in silico* através do banco de sequências depositadas no NCBI-Genbank no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Tabela 1. Iniciadores da reação de LAMP utilizados para a detecção genotípica de MBL, outras β-lactamases, região ITS entre os genes 16S e 23S do rRNA e *bla*_{Oxa-51} de *Acinetobacter baumannii*.

Genes	Iniciadores	Referência
bla_{Oxa-51}	F3	AGGCGATGCTATGAAAGC
	B3	CATGGATTGCACTTCATCTTG
	FIP	GGTACC GATATCTGCATTGCCAGTCGTATTGGACTTGAACCTGAACTCA
	BIP	TTTGGCTGGGTCTTTGCTAGCTTGTAAAGCAAAGCTG
	F2	AGGCGATGCTATGAAAGC
	B2	AATTACTCCTCAGCAAGAGGC
bla_{NDM-1}	F3	GCATAAGTCGCAATCCCCG
	B3	CTTCCTATCTCGACATGCCG
	FIP	GAGATCAACCTGCCGGTCGCTTTTTCCATACCGCCCATCTTGT
	BIP	TCTGGGGCGGTCTGGTCATCGTTTTTCCAAACGGTTTGATCGTCA
	F2	ACCACCAGCACGGCGGCCATC
	B2	GGTGACTIONCACGGCATCAGG
ITS	F3	CGGTAATTAGTGTGATCTGAC
	B3	CATTTTCAGTTTAGAGCACTGT
	FIP	TTGCTTAACCTAAACTCTTGAGTGAGAAGACACATTAACCTATTATTAACAGA
	BIP	AGCAAATTAACCTGAATCAAGCGTTTACTTAAGCACCGTACAGC
	F2	AATTTATTTTCAGACTCAATTTTGCCAA
	B2	GGTATGTGAATTTAGATTTAGATTGAA

8.4.3. Condições de amplificação das reações de LAMP

O volume final das reações foi de 25µl contendo: 2,5µl de tampão 10X (New England BioLabs), 1µl *DNA Polymerase Large Fragment (Bst)* (8U) (New England BioLabs), 4µl de Betaína a uma concentração de 0,8M (PROMEGA®), 2µl de MgCl₂ (6 mM) (PROMEGA®), 3,5µl de dNTP (1400 µM) (PROMEGA®) 0,8µl dos iniciadores internos (FIP/BIP) a (50µmol), 0,1µl dos iniciadores externos (F3/B3) a (50µmol) e 0,4µl dos iniciadores -Loop (B2/F2) a (50µmol), 5,4µl de água tipo ABD e 4µl de DNA alvo. Para cada reação foi testado um gradiente de temperatura de amplificação entre 40 °C a 60 °C, bem como o tempo ótimo de amplificação para cada iniciador testado, variando de 40 a 60 minutos.

Foram testadas três metodologias diferentes para visualização do produto amplificado por LAMP, o uso de um corante *Hidroxinaftol blue*, um intercalante de DNA o *SYBR Green*, e o uso de uma corrida eletroforética utilizando gel de agarose a 1%. Foi adicionado 1µl *Hidroxinaftol blue* 120µM (Sigma-Aldrich) antes do processo de amplificação a cada tubo, juntamente com o Master Mix. Após processo de amplificação as amostras eram verificadas a olho nu quanto a mudança de cor, sendo consideradas positivas apresentando cor azul (GOTO *et al*, 2009). Foi adicionando 1µl de *SYBR Green* em diluição de 1:10 em DMSO, em cada tubo pós período de amplificação, os tubos foram deixados em bancadas por 15 minutos e em seguida foram levados para serem visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta, sendo considerado positivo aqueles que emitissem fluorescência com tonalidade verde. Outra forma testada para visualização dos

resultados foi a utilizando uma corrida eletroforética, 3µl do produto da reação de LAMP foram misturados a 1µl de solução contendo diluição de GelRed 10.000X (Biotium®) em tampão de coloração 6X (PROMEGA®) na concentração de 1:1, aplicados em gel de agarose a 1%, submetidos à corrida em voltagem 90 volts por aproximadamente 120 minutos imersos em solução de TBE, posteriormente o gel foi levado ao transiluminador de luz ultravioleta para visualização.

Para teste confirmatório dos produtos amplificados em LAMP, todos os resultados obtidos foram correlacionados a metodologia padrão ouro de amplificação de DNA que é a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional).

Para o gene *bla_{KPC-2}* foi utilizado o iniciador Foward 5´-(GCAATGTCACTGAATACTCGT 3´) e Reverse (5´-GCGATCCTTCCAACCTCGT-3´) possuindo 892 pares de bases. As condições da ciclagem foi de acordo com Jones e colaboradores (2009).

Para o gene *bla_{NDM-1}* foi utilizado o iniciador Foward (5´-(GCAATGTCATGAATATACTCGT-3´), e Reverse (5´-GCGTCCTTCCAACCTCGT-3´) possuindo 1100 pares de bases, de acordo com as condições citadas por Pak e colaboradores. (2012).

Para o marcador espécie específico para *A. baumannii bla_{Oxa-51}*, Foward (5´-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3´) e o Reverse (5´-ATTTCTGACCGCATTTCAT-3´), com 353 pares de bases. As condições da ciclagem foram: 94 °C por 1 minuto, 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 5 minutos, 72 °C por 1 minuto com 35 ciclos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os produto amplificado em PCR convencional foi aplicado em gel de agarose a 1%, corados com GelRed 10.000 X (Biotium®), o gel foi submerso em solução TBE 1X (Tris/Borato/EDTA), em voltagem de 120 minutos a 90 volts. Após corrida o gel as bandas foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta.

8.5. Detecção de variantes da OXA-51 (Artigo I-Anexos)

Durante o processo de padronização da técnica de *SYBR Green*, observou-se a formação de uma curva de *Melt* diferente do controle positivo que estava sendo utilizado uma amostra de *A. baumannii* ATCC 19606, foi realizado sequenciamento dos produtos amplificados por qPCR que apresentaram estes picos, e através de análise junto ao *GeneBank* do NCBI, verificou-se ser todas amostras de *A. baumannii*, alguns outros testes

foram utilizados afim de se verificar se as amostras pertencem a subtipos/variantes da *bla_{OXA-51}*.

8.5.1. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A técnica de eletroforese em campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) foi empregada a fim de se verificar o polimorfismo das amostras. Utilizando-se o protocolo descrito por Seifert e colaboradores (2005). As amostras de *A. baumannii* obtidas do mini-BAL, preservadas em meio de criopreservação foram ressuspensas em meio TSA por um período de 18-24 horas em estufa a 35 °C. Após crescimento foi preparada uma suspensão destas colônias com salina, esta suspensão apresentou uma transmitância de 15% medida com uso de um espectrofotômetro. A seguir, uma alíquota de 200µl desta suspensão foi transferida para microtubo de centrifuga contendo 10µl de proteinase K (20mg/mL) e 5µl de lisozima (40mg/mL). Após leve homogeneização, 200µl de agarose para PFGE a 1%, em solução com TE foram acrescentados a cada tubo, a mistura dispensada em moldes descartáveis para preparo dos cubos de agarose. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os cubos de agarose solidificados foram transferidos para tubos de fundo cônico de 50mL contendo 5mL da solução de lise celular e 25µl de proteinase K (20mg/mL). Os tubos foram incubados por 2 horas, a 55 °C sob agitação de 150 rpm. A seguir, o tampão foi acrescentado e os cubos lavados por duas vezes com água destilada estéril, por 20 minutos cada lavagem, e por quatro vezes com tampão TE, por 20 minutos. As lavagens foram realizadas a 50 °C, sob agitação de 150 rpm. Após lavagem, os cubos foram cortados com espessura de 2mm e submetidos à digestão com a enzima ApaI, a concentração de 50U. Os cubos foram incubados a 37 °C, por 18-24 horas, e a seguir, dispensados em gel de PFGE, em concentração de 1% em TBE 0.5X, em molde compatível com a cuba utilizada. Para normalização do gel foi utilizado o marcador de peso molecular Lambda PFG Marker (New England Biolabs) em três canaletas do gel (início, meio e fim). A eletroforese foi realizada em sistema CHEF-DR III, com pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 20 segundos, tempo de corrida de 19h, a 6Vcm, e 14 °C. Após eletroforese, o gel foi corado por 30 minutos em brometo de etídio (40mg/L em água destilada) e descorado por três vezes, 20 minutos cada, em água destilada. A imagem do gel, sob iluminação ultravioleta, foi realizada em fotodocumentador e analisada no software de bioinformática *BioNumerics* v.7.5. (Applied Maths). Dendrograma foi gerado a partir da marcação das bandas, utilizando o coeficiente de Dice e o método UPGMA, com tolerância e otimização de 1%. Pulsotipo foi definido

como o padrão de bandas idênticas.

8.5.2. Análise por Multilocus Sequence Typing (MLST)

A ancestralidade e distribuição global dos isolados foram determinadas por meio da análise de *multilocus sequence typing* (MLST) de sete genes constitutivos como descritos na tabela 2, conforme padronização disponibilizada pelo Instituto Pasteur, em reações com 50µl de volume final constituídas de 34µl de água; 5µl de Buffer 10X; 3µl MgCl₂ (25mM); 4µl dNTP (1,25mM cada); 1µl de cada primer (10µM); 0,17µl de Taq DNA polimerase (5U/µl) e 2µl de DNA. Após amplificação e verificação da eficiência dos ensaios de PCR por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, os produtos obtidos foram purificados e sequenciados, e, após alinhamento das fitas *sense* e *antisense* de cada um dos alelos, as sequências consenso serão submetidas à análise comparativa com aquelas disponíveis no banco de dados disponibilizado pelo Instituto Pasteur (www.pasteur.fr/mlst). De acordo com a combinação dos alelos dos sete genes, será atribuído um número de *sequence type* (ST). A distribuição dos ST em complexos clonais será determinada utilizando-se a ferramenta *eBurst* (<http://eburst.mlst.net/>).

Tabela 2. Iniciadores, tamanho do produto esperado e condições de amplificação MLST.

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
<i>cpn60</i> (Chaperonina 60- KDa)	cpn60F cpn60R	ACT GTA CTT GCT CAA GC TTC AGC GAT GAT AAG AAG TGG	405
<i>fusA</i> (proteína de elongação)	FusaF FusaR	ATC GGT ATT TCT GCK CAC ATY GAT CCA ACA TAC KYT GWA CAC CTT TGT T	633
<i>gltA</i> (Citrate sintase)	GltA F GltA R	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	483
<i>pyrG</i> (CTP sintase)	PyrGF PyrGR	GGT GTT GTT TCA TCA CTA GGW AAA GG ATA AAT GGT AAA GAY TCG ATR TCA CCM A	297
<i>recA</i> (fator de recombinação homólogo)	RecAF RecAR	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	372
<i>rplB</i> (proteína L2 da porção ribossomal 50S)	RplBF RplBR	GTA GAG CGT ATT GAA TAC GAT CCT AAC C CAC CAC CAC CRT GYG GGT GAT C	330
<i>rpoB</i> (subunidade B da RNA polimerase)	RpoBF RpoBR	GGC GAA ATG GC(AGT) GA(AG) AAC CA GA(AG) TC(CT) TCG AAG TTG TAA CC	456

¹http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Abaumannii.html

8.5.3. Detecção de genes de OXA β -lactamases em *A. baumannii* por meio de ensaios de PCR convencional.

Para a detecção dos grupos principais, oxacilinasas (OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like OXA-143-like) usou-se a técnica de PCR multiplex de acordo com (WOODFORD *et al.*, 2006; HIGGINS *et al.*, 2010).

8.5.4. Detecção de genes variantes de *bla*_{OXA-51} em *A. baumannii* por meio de ensaios de PCR convencional.

Os DNA das amostras de *A. baumannii* foram extraídos utilizando metodologia de lise térmica de acordo com (MOREIRA *et al.*, 2017b). As variantes da *bla*_{OXA-51} foram identificados usando duas metodologias a de Heritier e colaboradores (2005) e a de Pournaras e colaboradores (2014). Os resultados do sequenciamento foram comparados às sequências depositadas no *GeneBank*.

8.5.5. A detecção de outros genes de carbapenemases em *A. baumannii*

Todas as sete amostras de *A. baumannii* foram testadas quanto à presença de outras carbapenemases como NDM, SPM, IMP, VIM, KPC e OXA-48 circulantes no território brasileiro, utilizou-se a metodologia de PCR convencional, de acordo com Poirel e colaboradores (2011).

8.6. Comparação da especificidade e sensibilidade das três gerações de PCR

8.6.1. Extração de ácido nucleico

As 44 amostras de mini-BAL foram levadas ao sonicador, por 30 segundos e pausa de 30 segundos, repetindo esta operação por 3 vezes, após este processo todas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.500 rpm, posterior a este processo o sobrenadante foi descartado e 200 μ l do material centrifugado foi usado para extração de DNA, utilizando o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as diretrizes do fabricante. O DNA extraído foi mantido em um freezer a -80 °C.

8.6.2. Ensaio de PCR convencional

O DNA dos 44 espécimes clínicos extraídos foram testados quanto a amplificação por metodologia de PCR convencional. Foi utilizado o termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf® Hamburgo, Alemanha) e o marcador espécie-específico, para

detecção de *A. baumannii* o *bla_{oxa-51}*, Forward (5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'), Reverse (5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3 ') (WOODFORD *et al.*, 2006). A reação final de 25 µL consistiu-se de 12,5µl de mistura mestre 2x (PROMEGA®, Wisconsin, EUA), 1µl do iniciador Reverse (10µM), 1 µl do iniciador Forward (10µM), 2µl de DNA (50 ng/µl) e 8,5µl de água de tipo ABD. As condições de PCR foram realizadas da seguinte forma: 94 °C durante 3 minutos e 94 °C durante 45 segundos durante 35 ciclos, 60 °C durante 5 minutos, 72 °C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose a 1%, coradas com GelRed e visualizadas em transiluminador.

8.6.3. Ensaio com SYBR® Green em qPCR

A quantificação das 44 amostras de mini-BAL foi realizada utilizando 12,5µL de SYBR® Green PCR 2X Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 1µL de Forward (10 µM) (5'-TTTAGCTCGTCGTATTGGACT-3 ') 1 µL de Reverse (10 µM) (5'-CCTCTTGCTGAGGAGTAATTTT-3') (10 µM) (GADSBY *et al.*, 2015), 4,5µL de água do tipo ABD e 1µL de DNA (20 ng/µL) com volume final de reação de 20µL. O qPCR foi realizado a PCR StepOne™ Real-Time (Applied Biosystes, Califórnia, EUA) com ciclagem de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C. Após 40 ciclos, uma curva de *melting curve* foi testada com temperaturas entre 60 °C e 95 °C com uma leitura a cada 0,3 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata. A amplificação específica de qPCR foi confirmada verificando a curva de fusão do gene alvo em cada amostra. O software ABS 7500 Fast System SDS v. 1.4 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) foi usado para construir uma curva padrão de seis pontos a fim de extrapolar um resultado quantitativo. Os testes foram aceitos se as curvas padrão fossem lineares (eficiência de reação de 90-110%, R²> 0,98).

8.6.4. Ensaio de TaqMan® em qPCR

O DNA extraído do mini-BAL foi quantificado usando o Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). Com volume final da reação de 20µL constituído de 10µL de Master Mix QuantiTect® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) 1µL de sonda (10pmol) (5' - 56-FAM-CCTTGAGCA / ZEN / CCATAAGGCAACAC / 3IABKFQ-3'), 0,7 µL de iniciador para Forward (10pmol) (5'-CCTGCTTCGACCTTCAAATG-3') 0,75µL Reverse (5'-TGCCCGTCCCCTTAAATAC-3') (10 pmol), 1µL de MgCl₂ (25 mM), 4,5µL de H₂O 2 µL de DNA (20 ng/µL). As condições de ciclagem foram as seguintes: 95 °C por 10

minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 60 segundos. Todos os testes foram realizados em triplicatas. A amplificação específica de qPCR foi confirmada pela verificação da curva de fusão do gene alvo em cada amostra. A detecção do sistema PCR CFX96 Touch em tempo real (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) foi utilizada para construir uma curva padrão de seis pontos e extrapolar um resultado quantitativo. Os testes foram aceitos se as curvas padrão fossem lineares (eficiência de reação de 90-110%, $R^2 > 0,98$).

8.6.5. Ensaio da Droplet Digital PCR ou (ddPCR)

O DNA extraído dos espécimes clínicos foi quantificado utilizando o sistema de PCR QX200™ Droplet Digital™ (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a reação apresentou volume final de 20µL constituindo de 10µL de *EvaGreen* ddPCR 2x Supermix (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), 1µL de sonda (5'-56-FAM-CCTTGAGCA/ZEN/CCATAAGGCAACAC/3IABKFQ-3'), 0,75 µL de iniciador Forward (10pmol) (5'-CCTGCTTCGACCTTCAAATG-3'), 0,75 µL de Reverse (-5'-TGCCCGTCCCCTTAAATAC-3') (10 pmol), 1µL de MgCl₂ (25 mM), 4,5 µL de H₂O, 2 µL de DNA. Após descanso por 3 minutos à temperatura ambiente os 20µL de reação foram colocados no cartucho para geração de gotículas utilizando as 8 canaletas (Bio-Rad Laboratories, EUA) e 70µL de óleo para geração de gota (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) foi adicionado a cada canaleta. Aproximadamente 20.000 gotículas foram geradas em cada tubo utilizando o gerador de gotículas QX200 (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). Após o processamento, a emulsão de gotícula foi preparada e (40µL) foi transferida para a placa contendo 96 poços (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A placa foi subsequentemente selada a quente com selante apropriado usando o selador de placa PCR PX1™ (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). A amplificação da placa foi realizada utilizando o termociclador Px2 (Thermo Electron corporation, EUA). As condições de amplificação foram as seguintes: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 60 segundos, 1 ciclo de 95 °C durante 10 minutos. As reações foram otimizadas em relação ao anelamento da fita (no intervalo entre 54 °C e 60 °C). Após a amplificação, a placa foi lida de forma individualizada pelo leitor de gotículas QX200 (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), os resultados foram analisados pelo software de leitor de gotículas Quanta Soft, versão 1.6.6.0320 (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). A concentração absoluta de cada amostra foi relatada automaticamente pelo software ddPCR, calculando a proporção das gotículas positivas sobre as gotículas totais

combinadas com a distribuição de Poisson.

8.6.6. Teste para definir a especificidade analítica

Para verificar a especificidade analítica das três gerações de PCR, um painel de bactérias de referência foi utilizado sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27799, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), a escolha foi feita porque são espécies comumente isoladas em cultura quantitativa em amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. O DNA das bactérias de referência (ATCC) foi extraído por lise térmica de acordo com Moreira e colaboradores (2017b), sendo cada amostra testada em triplicata a fim de se avaliar a produtividade do ensaio.

Todas as sequências de oligonucleotídeos usadas foram verificadas utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento utilizando o banco de dados do *GenBank* para especificidade *in silico*.

Para desenhar a sonda utilizada na *TaqMan*[®] e na ddPCR, utilizou-se o ferramenta iPrimer3 Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2012).

8.6.7. Teste para definir a sensibilidade analítica

Para comparar a sensibilidade e a precisão entre as três gerações de PCR, o DNA de 100 UFC/mL da amostra de referência *A. baumannii* ATCC 1906 foi extraído por lise térmica de acordo com Moreira e colaboradores (2017b), após extração o DNA foi diluído em escala de 10 entre (10^1 a 10^{15}), com concentração inicial de DNA de 102 ng/ μ l (10^1).

9. Aspectos éticos

Este projeto foi submetido à Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE do Hospital das Clínicas e ao Comitê de Ética e Pesquisa - COEP/UFMG sendo eles aprovados: Projeto CAAE 23476313.6.0000.5149.

10. Resultados

10.1. Características dos pacientes avaliados

No período de Novembro de 2013 a Julho de 2015, foram coletadas 44 amostras de mini-BAL de pacientes que estavam internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, todos estes se enquadravam no critério de inclusão do estudo. Após a coleta os espécimes clínicos foram processados no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

De maneira geral, um pouco mais da metade dos pacientes era do sexo masculino (52,28%), com idade média de $57,2 \pm 19$. As principais comorbidades apresentadas por estes pacientes foram hipertensão arterial (22,72%), neoplasias (18,2%) e insuficiência renal e hepática (11,4%). Em relação ao uso de antimicrobianos 21 (47,7%) faziam uso de algum carbapenêmico e 15 (34%) pacientes usaram polimixina B durante seu seguimento de permanência na UTI. As principais características apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão são demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Dados recuperados dos pacientes inclusos neste estudo ($n= 44$) via prontuário.

Característica	Valores
Idade (anos)	57,2 ± 19
Sexo	
Masculino	($n=23/ 52,28\%$)
Feminino	($n=21/ 47,7\%$)
Uso de antimicrobianos	
Carbapenêmicos	($n=21/ 47,8\%$)
Polimixina	($n=15/ 34\%$)
Aminoglicosídeos	($n=6/ 13,6\%$)
Outros β -lactâmicos	($n=6/ 13,6\%$)
Cefalosporinas	($n=6/ 13,6\%$)
Quinolonas	($n=2/ 4,5\%$)
Glicopeptídeos	($n=17/ 38,6\%$)
Antifúngicos	($n=6/ 13,6\%$)
Antivirais	($n=3/ 6,8\%$)

Principais comorbidades	
Hipertensão arterial	(n=10/ 22,72%)
Neoplasias	(n=8/ 18,2%)
Insuficiência renal e hepática	(n=5/ 11,4%)
Pacientes com tubo orotraqueal	(n=34/ 72,28%)
Pacientes com suspeita de PAV	(n=32/ 72,7%)
Índice de mortalidade	(n=20/ 45,5%)

10.2. Análises fenotípicas

Todos os pacientes incluídos no estudo foram também avaliados quanto à colonização por micro-organismos da microbiota externa de relevância na vigilância epidemiológica, sendo estes testes realizados como parte da rotina do hospital das Clínicas, para todo paciente que entra na instituição no nível de internação. O procedimento foi realizado com o auxílio de um *Swab* em regiões perianal, nasal e axilar, foi realizado no laboratório de microbiologia da própria instituição de acordo com protocolo operacional padrão. O resultado do cultivo microbiológico do *Swab* foi registrado no prontuário do paciente, sendo resultado recuperado esta demonstrado na tabela.

10.3. Resultado microbiológico do mini-BAL

Foi isolado um total de 44 micro-organismos sendo *A. baumannii* o mais prevalente, isolado de oito espécimes clínicos (18,2%). O segundo micro-organismo mais isolado foi *S. aureus* (15,9%), seguido por *P. aeruginosa* (13,6%) (Tabela 4).

Tabela 4- Ordem de frequência de micro-organismos isolados dos espécimes de mini-BAL avaliados.

Ordem de frequência	Micro-organismo	Nº de isolados	Porcentagem (%)
1º	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	18,20%
2º	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	15,90%
3º	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	13,63%
4º	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	6,82%
4º	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	6,82%
4º	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	6,82%
5º	<i>Serratia marcescens</i>	2	4,50%

5°	<i>Enterococcus faecium</i>	2	4,50%
5°	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	4,50%
5°	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	4,50%
6°	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	2,28%
6°	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	1	2,28%
6°	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	2,28%
6°	<i>Escherichia coli</i>	1	2,28%
6°	<i>Candida tropicalis</i>	1	2,28%
6°	<i>Candida albicans</i>	1	2,28%
	Total	44	

10.4. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras recuperadas

Todas as amostras de *A. baumannii* (n=8) foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testados, com exceção da polimixina B.

10.5. Padronização da técnica de Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Em relação à técnica de FISH para detecção de *A. baumannii* direto dos espécimes clínicos, vários protocolos de fixação da amostra foram testados com o objetivo de preservar a integridade celular, porém devido à grande heterogeneidade dos espécimes clínicos como: ser aquosa, sanguinolenta e outras muito mucoídes, não foi possível estabelecer um protocolo único de tratamento para todos eles, tendo em vista que esta é uma etapa de extrema importância para o sucesso do processo de hibridização, essas características diversas representaram um desafio na verificação da acurácia da técnica.

A imagem em (A) demonstrada na figura 1 representa uma das análises obtidas pela técnica de FISH utilizando a amostra controle positivo, *A. baumannii* ATCC 19606 corado com DAPI, que é um corante para DNA. Através da visualização da imagem é possível observar que houve um perfeito processo de hibridização da amostra por DAPI, podendo fazer distinção do aspecto morfológico e contagem de bactérias por campo na lâmina.

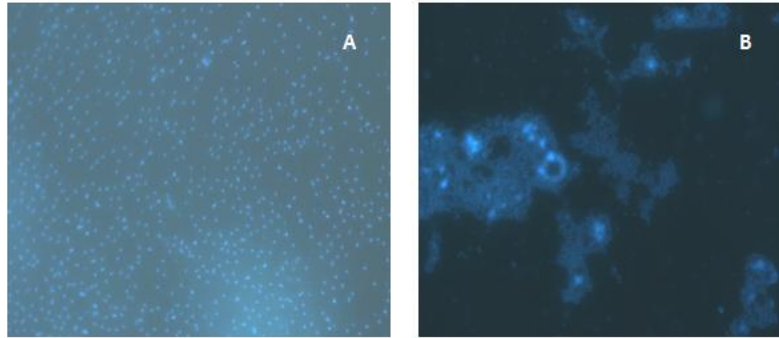


Figura 1. Resultado da visualização em microscópio de imunofluorescência da amostra de *A. baumannii* ATCC 19606 mini-BAL e corada com DAPI.

Entretanto a imagem (B) demonstrada na figura 2 apresenta uma amostra de mini-BAL sabidamente positiva em cultura quantitativa para *A. baumannii*, nota-se que houve a perfeita coloração com DAPI, porém não é possível fazer contagem de bactérias por campo na lâmina e nota-se a presença de aglomerados ou de células bacterianas ou ainda debrís celulares, não sendo possível estabelecer esta distinção com certeza.

Uma amostra de mini-BAL sabidamente positiva em cultura quantitativa foi testada com DAPI em (A) e com sonda específica para *A. baumannii* ABA1212 em (B), como demonstrada na figura 2, observou-se que não houve uma completa dispersão da amostra na lâmina, formando sempre aglomerados o que dificultou a contagem total das bactérias por campo. Obtivemos uma boa coloração da amostra com DAPI, porém a hibridização da amostra com uso da sonda notou-se a emissão de fluorescência de pontos que não condiz com a morfologia observada no controle positivo presente na figura 1, não sendo possível estabelecer um padrão confiável com os resultados de fluorescência obtidos pela sonda ABA 1212.

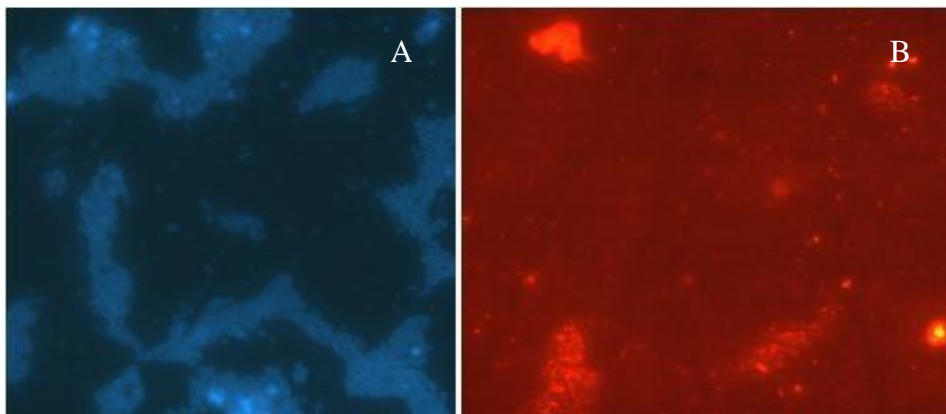


Figura 2. Visualização da técnica de FISH em amostras de mini-BAL coradas em (A) com DAPI e em (B) utilizando a sonda ABA1212.

10.6. Padronização da técnica de Amplificação Isotérmica mediada por Loop (LAMP)

No presente estudo, a técnica de LAMP, foi também proposta para se detectar a presença de *A. baumannii* diretamente do mini-BAL e, paralelamente, buscou-se ainda, padronizar a pesquisa de alguns genes de resistência pela mesma metodologia.

Inicialmente essa técnica foi empregada diretamente nas amostras de mini-BAL, com testes com algumas metodologias de tratamento da amostra, como uso de sonicador e vários protocolos de extração de DNA, porém não se obteve sucesso por essa via, o resultado da amplificação não condizia ao que era esperado pela técnica. Portanto todo o processo de padronização da técnica se deu utilizando DNA extraído a partir de colônias oriundas de cultura quantitativa.

O DNA das 44 amostras bacterianas isoladas em cultura demonstrada em (Tabela 4) foram testadas frente aos seguintes iniciadores da região ITS (Figura 3). Houve uma perfeita amplificação da amostra controle positivo *A. baumannii* ATCC 19606, frente às amostras de *A. baumannii* isoladas do mini-BAL, sendo a temperatura de 60 °C por 45 minutos a mais adequada para amplificação. Porém houve quatro amplificações inespecíficas entre as amostras testadas como demonstrada na figura 3, o que tornou a detecção do *A. baumannii* por este iniciador não confiável.

Esse comentário já é discussão

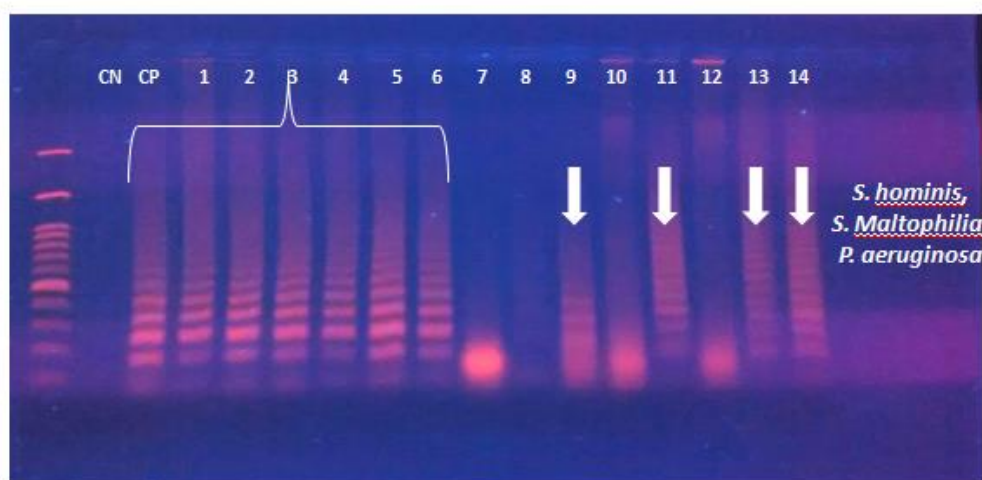


Figura 3- Resultado da amplificação da região ITS pela técnica de LAMP em gel de agarose a 1% sendo as amostras de (1 a 6) *A. baumannii*, (7) *Staphylococcus aureus*, (8)

Serratia marcescens, (9) *Staphylococcus hominis* (10, 11) *Stenotrophomonas maltophilia*, (12) *Klebsiella pneumoniae*, (13, 14) *Pseudomonas aeruginosa*

O gene *bla*_{Oxa-51} foi utilizado como marcador espécie-específico para detecção e identificação de *A. baumannii* demonstrado na figura 4, houve uma perfeita amplificação de acordo com que era esperado pela técnica sendo a melhor condição de amplificação testada foi à temperatura de 63° C por 50 minutos. Porém houve duas amplificações inespecíficas como demonstrado na figura 4, que deixaram a detecção do *A. baumannii* por este iniciador questionável.

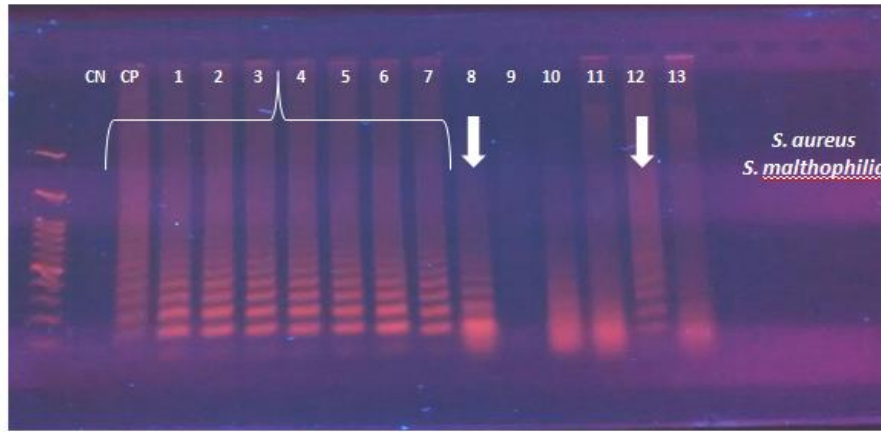


Figura 4- Resultado da amplificação bla_{oxa51} pela técnica de LAMP sendo as amostras de (1 a 7) *Acinetobacter baumannii*, (8) *Staphylococcus aureus*, (9) *Serratia marcescens*, (10) *Staphylococcus hominis*, (11,12) *Stenotrophomonas maltophilia*, (13) *Klebsiella pneumoniae*.

A detecção do gene bla_{KPC-2} pela técnica de LAMP (Figura 5) foi comparada com amplificação do genes por PCR convencional, a temperatura padronizada para amplificação do LAMP foi de 60° C por 45 minutos. Em relação aos resultados obtidos por LAMP houve amplificação de todas as 43 amostras testadas demonstrando como positivas para esse gene, em comparação com os resultados obtidos em PCR convencional não houve concordância entre os testes, tornando os resultados obtidos por LAMP, não confiáveis.

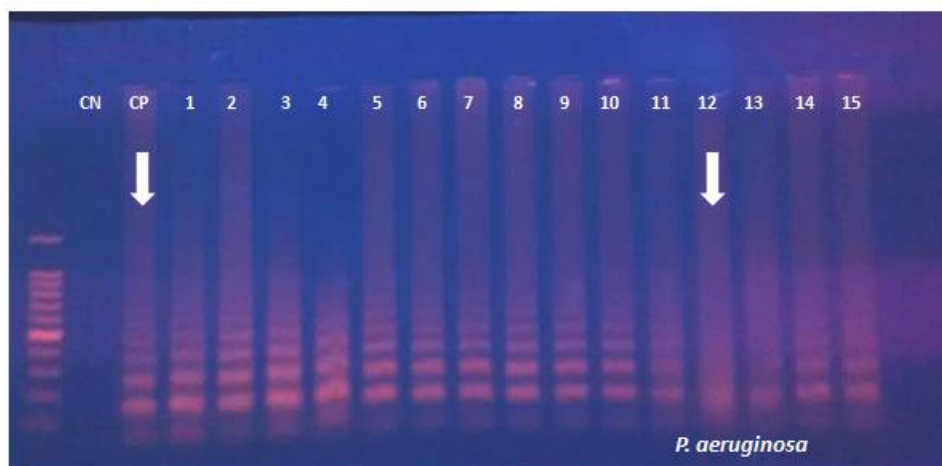


Figura 5- Resultado da amplificação bla_{KPC-2} pela técnica de LAMP sendo as amostras de (1 a 6) *Staphylococcus aureus*, de (7, 8) *Enterococcus faecalis*, (9,10) *Enterococcus faecium*, (11 a 13) *Pseudomonas aeruginosa*, (14 e 15) *Klebsiella pneumoniae*.

Em relação ao gene bla_{NDM-1} obteve-se uma excelente padronização da técnica

resultado no II artigo presente no anexo deste trabalho. Houve uma perfeita correlação entre os resultados obtidos pela técnica de LAMP com a técnica padrão ouro a PCR convencional Figura 6

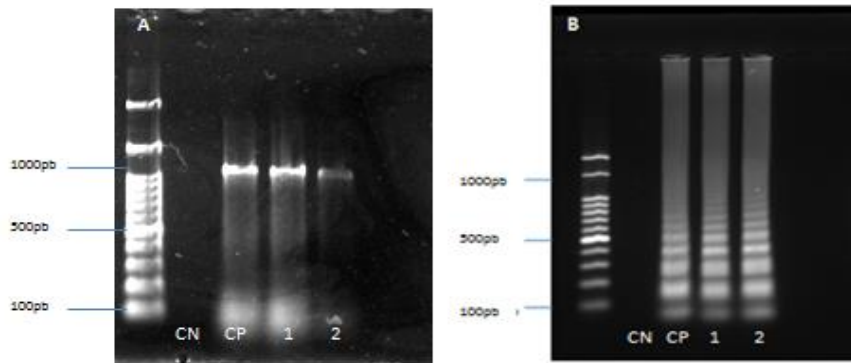


Figura 6– Imagem representativa da comparação das técnicas de LAMP e PCR convencional. Em (A) PCR convencional do gene *bla*_{NDM-1} (B) Técnica de LAMP para o gene *bla*_{NDM-1}. CN-controle negativo; CP-controle positivo; 1- amostra de *K.pneumoniae*; 2- amostra de *Providencia stuartii*.

Em relação aos produtos amplificados por LAMP, algumas metodologias foram testadas. Em relação a utilização da eletroforese em gel de agarose foi a melhor metodologia testada, o resultado obtido apresentou-se da forma característica da técnica, com a presença de um fragmentado de diversas bandas.

Outra maneira de se observar os resultados da amplificação pela técnica de LAMP, foi através da coloração *Hidroxi-naftol Blue* que é acrescentado antes do processo de amplificação. Conforme demonstrado na figura 7, não houve diferença colorimétrica entre as amostras testadas quanto estas comparadas aos controles positivo e negativo usados, tornando os resultados visualizados com a metodologia questionável.

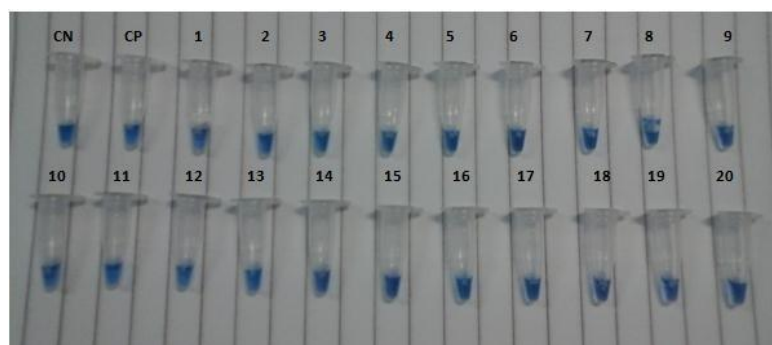


Figura 7- Resultado do teste com o corante *Hidronaftol Blue* para amostras de *bla*_{NDM-1} utilizando a técnica de LAMP.

Sobre o uso de um intercalante de DNA, usamos o *SYBR Green* sendo este outra alternativa para a leitura dos resultados de LAMP (TAO *et al.*, 2011). A adição do *SYBR Green* se dá após a reação de amplificação, sendo a leitura do resultado visualizado sob luz UV, quando positivo há emissão de fluorescência (PARIDA *et al.*, 2008).

Os resultados do uso do *SYBR Green* foram demonstrados na figura 8, houve uma distinção entre as amostras negativas e positivas, porém entre as amostras apresentadas nos tubos de 1 a 12 há amostras negativas o que não foi visualizado entre as amostras testadas, pois houve visualização da emissão de fluorescência entre os todos os tubos, tornando o resultado obtido não discriminativo.

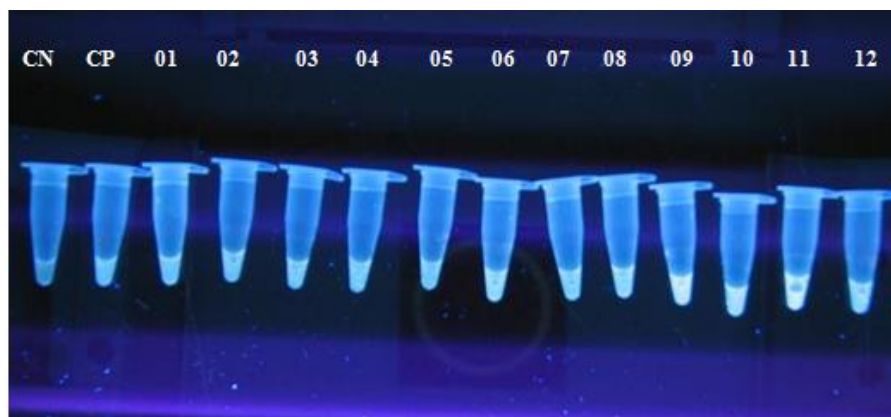


Figura 8 - Resultado do teste com o intercalante *SYBR*[®]*Green* visualizado em luz UV, com produto amplificado diluído 1: 100 em DMSO, para amostras de *bla*_{NDM-1} pela técnica de LAMP.

10.7. Detecção das variantes da OXA-51(Artigo 1)

10.7.1. Análises genotípicas

Após identificação fenotípicas das amostras de *A. baumannii* recuperadas no mini-BAL, todas as oito amostras foram confirmadas geneticamente utilizando o marcador espécie específico *bla*_{Oxa-51}, utilizando iniciadores e metodologia descrita por Woodford (2006). (Figura 9). Cujo resultado demonstrou que todas as oito amostras analisadas pelo método eram sugestivas de *A. baumannii*, o que foi confirmado através de sequenciamento

de todas as amostras e análise dos resultados obtidos as sequências depositadas no *GenBank* do NCBI .

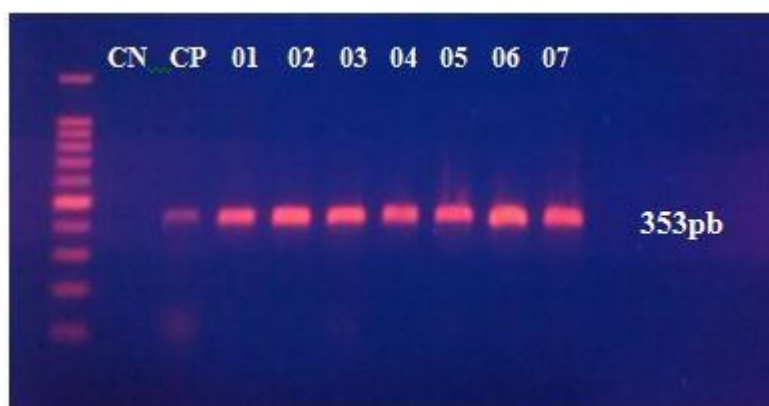


Figura 9. Resultado da análise genotípica demonstrada em gel de agarose para confirmação da identificação das amostras de *A. baumannii*.

10.7.2. Detecção de genes de OXA β -lactamases nas amostras de *A. baumannii*

Houve uma prevalência de 85% da bla_{OXA-23} nas amostras oito amostras avaliadas 100% apresentaram o bla_{OXA-51} , e duas amostras apresentaram o $bla_{OXA-143}$. Nenhuma das amostras analisadas apresentou a OXA-24, OXA-58. Tabela 5.

10.7.3. Detecção de outros genes de carbapenemases em *A. baumannii*

As oito amostras de *A. baumannii* foram testadas quanto à presença de outras carbapenemases como NDM, SPM, IMP, VIM, KPC e OXA-48 circulando no território brasileiro, porém não foi detectada entre as amostras analisadas a presença de nenhuma destas.

10.7.4. Detecção de genes variantes de bla_{OXA-51} em *A. baumannii*

As variantes da bla_{OXA-51} foram identificados usando duas metodologias Heritier e colaboradores. (2005) e Pournaras e colaboradores. (2014). Os resultados do material amplificado (Figura 10) foi sequenciado e comparados as sequências depositadas no *GeneBank*. Foi verificada a presença de quatro variantes ou subgrupo da OXA-51, sendo elas OXA-69, OXA-132, OXA-64, OXA-65. Tabela 5.

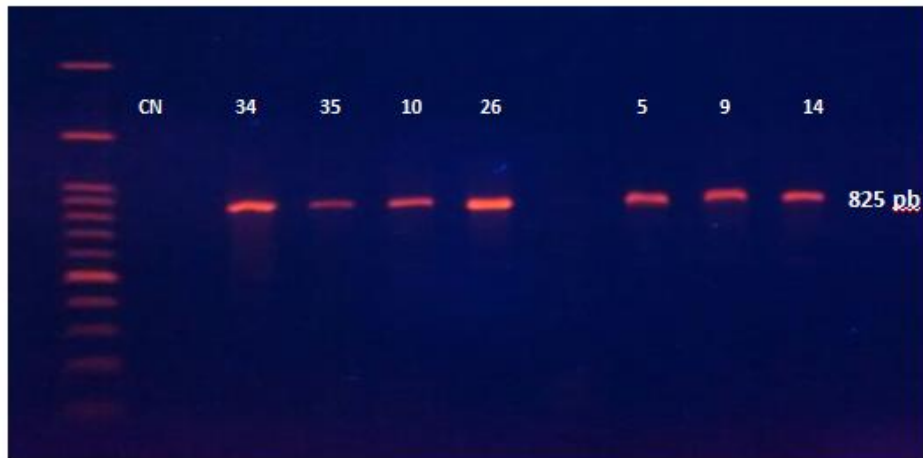


Figura 10- Resultado de Gel de agarose em eletroforese para amostras de *Acinetobacter baumannii* para variantes *bla*_{Oxa-51} segundo a metodologia de Pournaras e colaboradores (2014).

10.7.5. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

As amostras foram caracterizadas quanto ao polimorfismo genético pela técnica de PFGE, sendo possível identificar seis genótipos diferentes (amostras: 10, 26, 14, 34, 35) com perfis de similaridade variando entre (64,4% a 73%); sendo um genótipo (5 e 9) altamente relacionáveis com perfil de (97,1%) de similaridade entre eles (Figura 11).

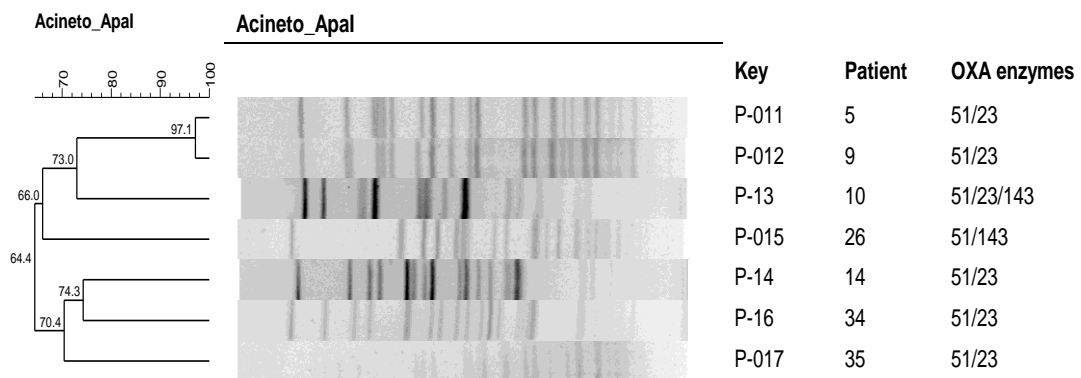


Figura 11- Tipagem de *A. baumannii* por eletroforese em campo pulsado (Pulsed field), após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *Apa*I.

10.7.6. Análise por Multilocus Sequence Typing (MLST)

As sequências dos (STs) encontrados no MLST foram analisadas e comparadas com aquelas já existentes no *website*. As amostras 5, 9 e 10 apresentaram o ST1 correspondente ao complexo clonal CC1; a amostra 14 apresentou o ST188 correspondente a um *Singleton*; a amostra 26 apresentou o ST113 pertencente ao complexo clonal CC25; a amostra 35 mostrou o ST15 pertencente ao complexo clonal CC15; e a amostra 34 apresentou o ST79 pertencente ao complexo clonal CC79. (Tabela 5).

Identificação da amostra	OXA-alelos	Alelo <i>bla</i> _{OXA-51}	MLST (Institute Pasteur)							CC*
			ST	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	
5	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
9	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
10	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
14	<i>bla</i> _{OXA143} -like <i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	132	188	1	3	6	1	3	4	Singleton
26	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA143} -like	64	113	3	3	3	4	7	4	CC25
34	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	65	79	26	2	2	2	29	4	CC79
35	<i>bla</i> _{OXA51} -like <i>bla</i> _{OXA23} -like	51	15	6	6	8	2	3	5	CC15

Tabela 5- Resultado da análise de multilocus sequence typing (MLST) e variantes da OXA-51 em amostras de *Acinetobacter baumannii*.

10.8. Comparação da especificidade e sensibilidade das três gerações de PCR

10.8.1. Análise da sensibilidade analítica das três gerações de PCR.

Através da diluição seriada na escala de 10 das amostras de *A. baumannii* ATCC 19606, determinamos a da sensibilidade analítica das técnicas, sendo para PCR convencional de 10^3 d equivalendo 1,02 ng/ μ l (Figura 12).

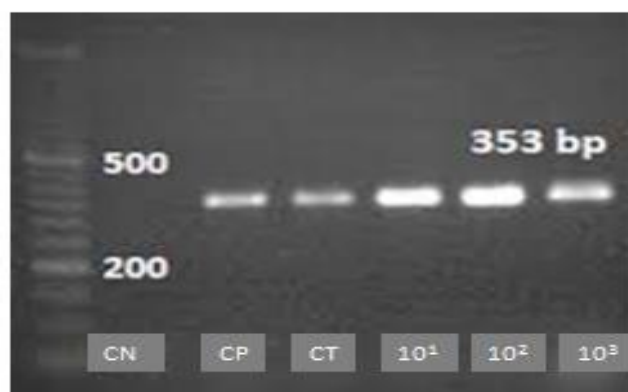


Figura 12 - Resultado da eletroforese em PCR convencional para alvo *bla*_{OXA-51}

Em relação aos resultados obtidos para qPCR usando *SYBR*[®]*Green*, o limite de detecção da reação foi de 10^{-6} equivalendo a (1,02 pg/ μ l). O valor de R^2 foi de 0,99 e a eficiência da reação foi de 97%. (Figura 13)

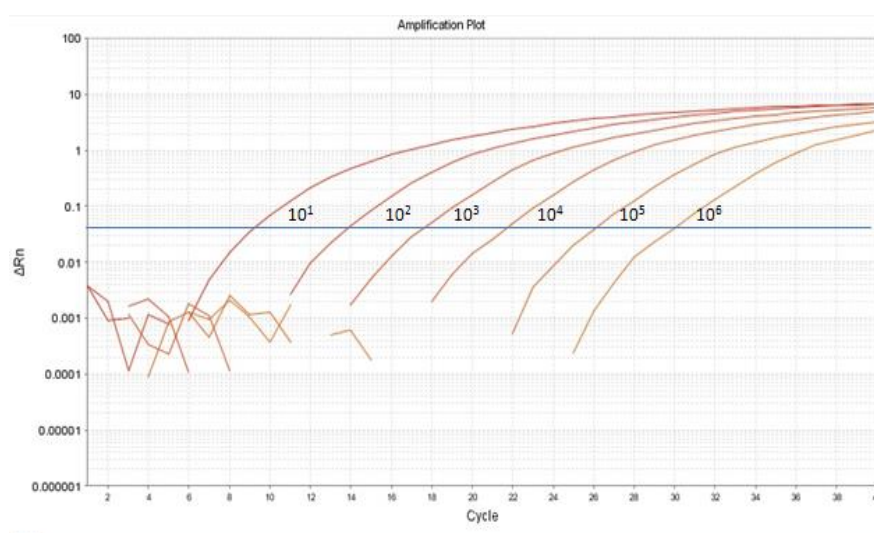


Figura 13 - Curva de *Melt* da qPCR usando *SYBR*[®]*Green*, da amostra de *A. baumannii* ATCC 10906 .

A *TaqMan* apresentou um limite de detecção 10^{-6} equivalendo a (1,02 pg/ μ l). O valor de R^2 foi de 0,95 e a eficiência da reação foi de 87% (Figura 14).

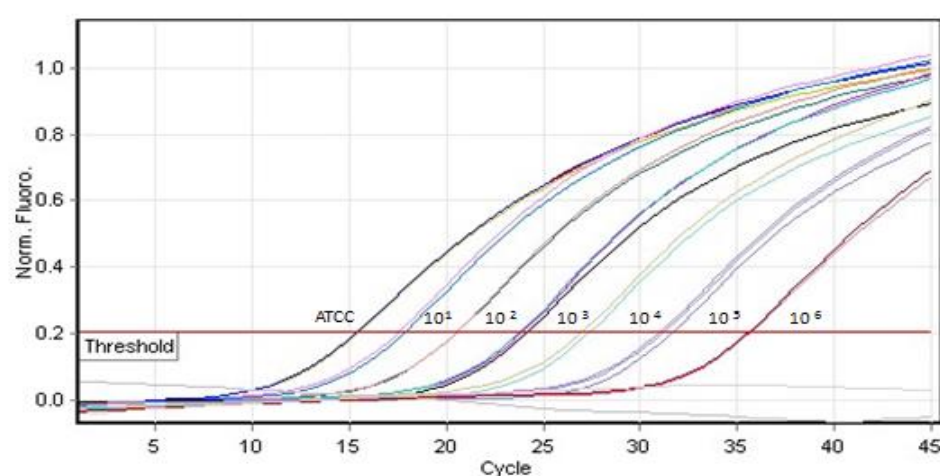


Figura 14 - Curva de *Melt* da qPCR usando *TaqMan*[®], da amostra de *A. baumannii* ATCC 10906.

Em relação aos resultados da ddPCR, o limite de detecção foi o mesmo obtido nas análises da qPCR de 10^{-6} (1,02 pg/ μ l) (Figura15).

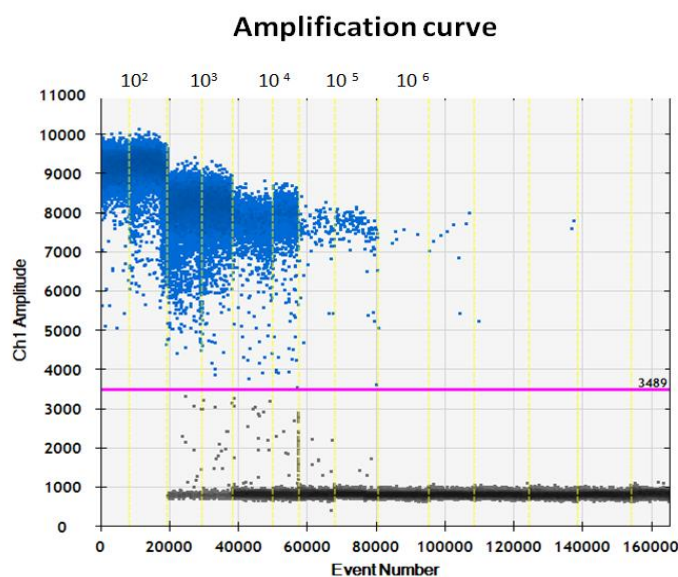


Figura 15- Curva de amplificação das ddPCR, demonstrando a sensibilidade analítica da diluição das amostras de *A. baumannii* ATCC 19606 na escala de 10. Em X estão demonstrados os valores da diluição de DNA na escala de 10, sendo 1 (10^{-2} até 10^{-6}) e os números de eventos, em Y os de amplitudes de emissão de fluorescência.

10.8.2. Análise da especificidade analítica das três gerações de PCR.

A técnica de PCR convencional e *TaqMan* demonstrou uma excelente especificidade frente ao alvo testado, não foi detectado nenhuma amplificação

inespecífica. Entretanto em relação ao *SYBR[®]Green* detectamos cinco ampliações inespecíficas como demonstrado na figura 16.

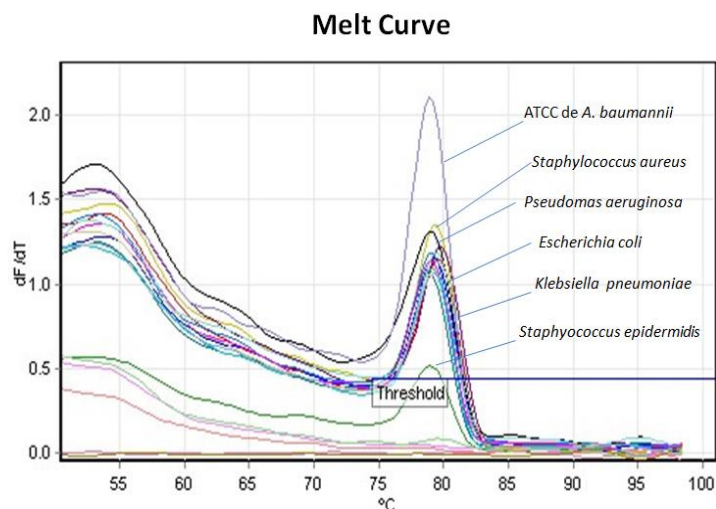


Figura 16- Curva de *Melt* da qPCR usando *SYBR[®]Green* para painel de bactérias de referência.

A especificidade da ddPCR demonstrou excelente, houve somente duas gotas positivas para as amostras de *S. aureus*, sendo estas estatisticamente insignificantes. (Figura 17)

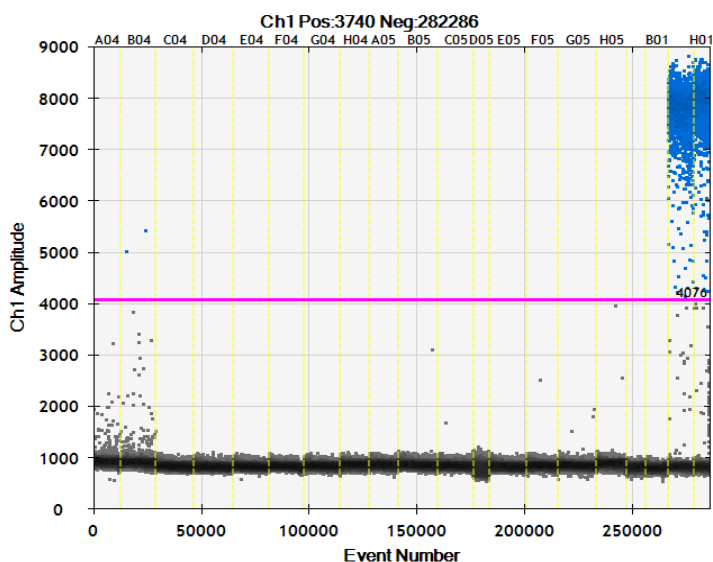


Figura 17– Resultado da especificidade analítica da dPCR usando um painel de bactérias. A4-B4: *Staphylococcus aureus*, C4-D4: *Pseudomonas aeruginosa*, E4-F4: *Klebsiella pneumoniae*, G04-H04: *Escherichia coli*, A5-B5: *Enterococcus faecalis*, D05:

Klebsiella oxytoca, E05-F05: *Enterococcus faecium*, G05-H05: *Staphylococcus epidermidis* BO1-HO1: Controle Positivo *A. baumannii* ATCC 19606.

10.8.3. Quantificação e amplificação das 44 amostras de mini-BAL

A amplificação direto das 44 amostras de mini-BAL, por PCR convencional foi comparada aos resultados positivos para *A. baumannii* em cultura quantitativa e para as informações sobre colonização da microbiota da pele recuperadas dos prontuários dos pacientes. Houve uma correlação de 75% entre os resultados da PCR e cultura quantitativa (Figura 18). Detectou-se Tb duas amplificações amostras 41 e 50, estes pacientes são negativos para cultura quantitativa, porém são positivos para colonização de pele e mucosas para *A. baumannii*.

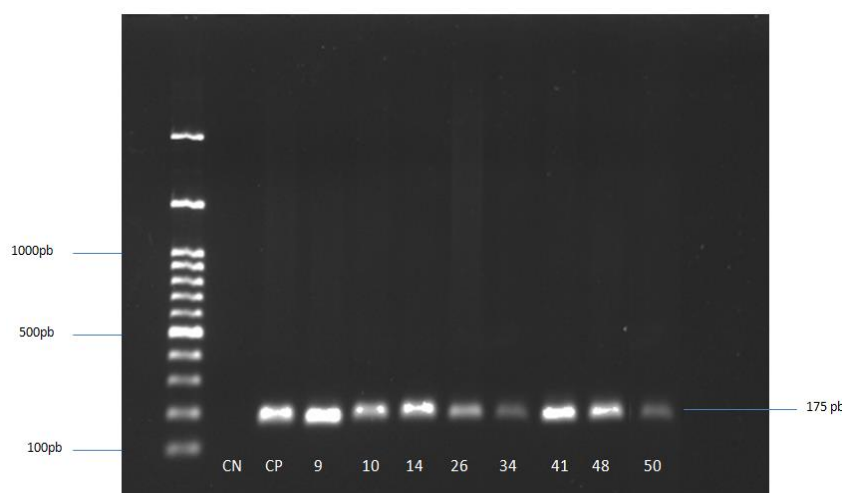


Figura 18 – Resultado da eletroforese em gel de agarose dos espécimes clínicos de lavado broncoalveolar

A quantificação das 44 amostras de mini-BAL por qPCR usando *SYBR[®]Green*, devida a baixa especificidade a quantificação encontrada se torna questionável, porém foi usada a nível de comparação qualitativa entre as técnicas como demonstrada na tabela 6.

A quantificação realizada usando *TaqMan[®]* encontrou-se algumas divergências principalmente entre as amostras negativas em cultura quantitativa para *A. baumannii*, como demonstrado na tabela 6.

Os resultados da quantificação por ddPCR, se mostraram mais próximos dos resultados obtidos em cultura quantitativa, podendo inferir uma comparação entre os resultados obtidos (Tabela 6).

Amostras	Resultado microbiológico	Contagem de UFC em cultura	PCR convencional	<i>SYBR</i> [®] <i>Green</i>	<i>SYBR</i> [®] <i>Green</i>	<i>TaqMan</i> [™]	<i>TaqMan</i> [™]	dPCR	dPCR
			Resultado da eletroforese	Média entre os Ct	Nº de cópias por µl	Média entre os Ct	Nº de cópias por µl	Quantidade de gotas positivas	Nº de cópias por µl
1	Negativo			28,08		38,8	117	0	0
2	Negativo			32,21		38,65	128	0	0
3	Negativo			29,9		39,2	91	0	0
4	Negativo			29,1		39,5	75	6	0,6
5	Colonizado/Cultura positiva	40 colônias		28,95		38,4	149	0	0
6	Negativo			30,7		40,42	42	0	0
7	Negativo			29,2		39,2	91	7	0,51
8	Negativo			29,37		40,16	50	12	1,2
9	Colonizado/Cultura positiva	incontáveis	Positivo	10,1	1x 10⁶	27,3	1,4x10 ⁵	1746	144
10	Colonizado/Cultura positiva	incontáveis	Positivo	19,52	2x10³	36,7	429	1027	78,3
11	Negativo			28,98		37,9	204	4	0,2
12	Negativo			28,8		40,3	46	0	0
13	Negativo			30,87		39,23	89	0	0
14	Colonizado/Cultura positiva	100 colônias	Positivo	25,62	2,8x10¹	29,5	3,7x10 ⁴	255	35,3
15	Negativo			30,41		39,6	71	0	0
16	Negativo			34,19		40,1	52	0	0
17	Negativo			31,66		40,12	51	11	1,8
18	colonizado			29,76		38,93	108	21	0,9
19	Negativo			37,9		40,05	54	0	0
20	Negativo			30,01		39,02	102	31	1,9
21	Negativo			30,03		39,09	97	0	0
22	Negativo			30,88		39,53	74	21	0
23	Negativo			28,97		36,45	501	21	0,62
24	Negativo			29,46		40,43	42	0	0

25	Negativo			29,98		39,37	82	0	0
26	Cultura positiva	incontáveis	Positivo	10,08	1x10⁶	33,26	3,6x10 ³	540	26,5
27	Negativo			29,09		37	356	4	0,34
28	Negativo			27,92		33,8	2,5x10 ³	12	1,23
29	Negativo			30,5		44,9		0	0
30	Colonizado			29,84		34,6	1,5x10 ³	6	0,29
31	Colonizado			30,33		31,9	8x10 ³	115	6,11
32	Negativo			30,22		39,06	99	0	0
33	Negativo			28,85		37,8	217	0	0
34	Colonizado/Cultura positiva	200 colônias	Positivo	23,3	1x10²	32,8	4,8x10 ³	727	71,4
35	Colonizado/Cultura positiva	79 colônias		30,02		30,03	2,6x10 ⁴	89	8,5
36	Negativo			30,37		38,49	141	0	0
37	Negativo			28,51		34,89	1x10 ³	16	1
38	Negativo			31,12		38,63	130	0	0
39	Colonizado			28,33		37,35	287	19	1
40	Colonizado			28,45		35,49	908	39	2,6
41	Colonizado		Positivo	28,42		34,64	1x10 ³	408	26,5
45	Negativo			23,55	1x10 ²	39,4	80	0	0
48	Colonizado/Cultura positiva	135 colônias	Positivo	29,15		35,9	704	433	27,6
50	Colonizado		Positivo	21,27	5x10²	38,4	149	87	6,9

11. Discussão

Em um ano e nove meses de coleta, 44 pacientes foram avaliados nesse estudo, sendo que 32 (72%) apresentaram suspeita de PAV do ponto de vista clínico, no momento de sua inclusão e 20 (45,5%) vieram a óbito durante o período de internação hospitalar. De acordo com a literatura, casos de pneumonia nosocomiais estão associados à ventilação mecânica (VM) em 86% dos casos, com letalidade, variando de 33% a 71%, e a relação os índices de mortalidade podendo atingir 55% (BORK *et al.*, 2015, LAN *et al.*, 2016), dados que corrobora com os resultados obtidos.

Em relação aos resultados microbiológicos do mini-BAL, *A. baumannii* destacou-se como o micro-organismo mais prevalente, sendo isolado de oito (18,2%) espécimes clínicos. Outros autores também relatam a espécie *A. baumannii* como principal agente etiológico de PAV na Índia (MATHAI *et al.*, 2012), na Espanha (LÓPEZ-CORTÉS; RODRIGUEZ BAÑO, 2014) e no Brasil (CASERTA *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2013). O segundo micro-organismo mais recuperado dos espécimes avaliados foram *S. aureus* (15,9%), seguido por *P. aeruginosa* (13,6%), *K. pneumoniae* (6,8%) e *Enterobacter cloacae* (4,5%).

Os resultados dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos realizadas nas oito amostras de *A. baumannii* pelo sistema VITEK[®] II mostraram que todas as amostras foram resistentes a todas as classes de cefalosporinas, às fluoroquinolonas e aos carbapenêmicos testados, apresentando sensibilidade somente à polimixina B testada através do Etest[®]. As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos registradas em amostras de *A. baumannii* apresentam um grande desafio terapêutico da atualidade para tratamento de infecção causada por esse agente, especialmente porque estão associados a elevadas taxas de mortalidade e aumento da permanência hospitalar (SOUDEIHA *et al.*, 2017). Além disso, a falta de antimicrobianos efetivos contra amostras de *A. baumannii* MDR levou à reutilização da polimixina B e E nos últimos anos, mesmo estes apresentando maior risco de toxicidade (BUSTIN *et al.*, 2009; NEONAKIS *et al.*, 2011). O uso de antimicrobianos, de forma inadequada ou indiscriminada, foi relacionado ao agravamento de casos de PAV em dois estudos realizados por Rocha e colaboradores (2008) e, Silva e colaboradores (2011), mostrando que entre 35% a 48% dos pacientes que desenvolveram esta infecção receberam antibioticoterapia empírica inadequada para o agente etiológico envolvido, o que reforça a necessidade de estudos de otimização no diagnóstico microbiológico dessa infecção.

Na população de amostra de *A. baumannii* avaliadas nesse trabalho observamos

a presença das oxacilinases *bla*_{OXA23} em 86% das amostras e *bla*_{OXA143} em duas amostras. Esses resultados corroboram com diversos relatos de surtos por *A. baumannii* envolvidos com infecções dentro do território brasileiro. Provavelmente isso se deve à capacidade de transferência horizontal de elementos genéticos móveis frequentes nesta bactéria (LEE *et al.*, 2017). No Brasil, a primeira descrição de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos foi em 2003, em oito amostras produtoras de OXA-23 (DALLA-COSTA *et al.*, 2003). A partir de então, observa-se o relato de amostras clínicas de *A. baumannii* carreadoras do gene *bla*_{OXA-23} em várias regiões do Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2014; CHAGAS *et al.*, 2014, CAMARGO *et al.*, 2015). A ocorrência de *bla*_{OXA143-like}, inclusive em combinação com o gene *bla*_{OXA-23-like}, foi observada entre as amostras, indicando a capacidade de acumular determinantes de resistência, sendo atualmente o *bla*_{OXA143-like} encontrado apenas em território brasileiro (CAMARGO *et al.*, 2015, LEE *et al.*, 2017).

O estudo do polimorfismo genético pela técnica de PFGE identificou um grande polimorfismo entre as amostras de *A. baumannii* avaliadas, este fato se torna interessante pela ocorrência de seis genótipos diferentes, em um período curto de coleta e em um ambiente tão restrito à entrada e à saída de pessoas. Estes dados foram reforçados com os achados do MLST cuja as sequências analisadas buscam explorar as relações entre as linhagens já que, por exemplo, a recombinação pode ocorrer frequentemente em muitas espécies de micro-organismos e o uso destes programas tem um impacto evidente na capacidade de discernir a verdadeira relação entre estas e a disseminação mundial de clones (TAVANTI *et al.*, 2005).

Os grupos de genótipos relacionados são geralmente referidos como um complexo clonal e é definido como o agrupamento dos Sequencias Tipo (STs) de uma população que compartilha a igualdade dos seus genótipos estudados, inferindo qual é o ST “fundador ou ancestral” de cada complexo (BOUGNOUX *et al.*, 2002; TAVANTI *et al.*, 2005, CHOWDHARY *et al.*, 2006, ODDS, JACOBSEN, 2008).

Portanto após a análise das sequências dos alelos (STs) obtidas, verificamos a presença de quatro complexos clonais distintos e um *Singleton*, sendo que ($n=3/7$) apresentaram o ST1-correspondente ao complexo clonal (CC1). Existem três clones de *A. baumannii* epidêmicos, comumente referidos como clones internacionais correspondentes ao Complexo Clonal I, II e III respectivamente CC1, CC2 e CC3, estes são responsáveis por surtos hospitalares e têm sido identificadas por todo o mundo, sendo considerados atualmente os CC1 e CC2 como os maiores complexos clonais

registrados para *A. baumannii* (SUNG, 2012; KANAMORI *et al.*, 2015). Observou-se também a ocorrência de um CC emergente, o CC25 em associação com o *bla*_{OXA-23} (CHAGAS *et al.*, 2014; CARMARGO *et al.*, 2015). Pournaras *et al.* (2014) cita a variante de *bla*_{OXA-51} a *bla*_{OXA-64} em associação CC25, dados também encontrados em nosso estudo. ST25 é o fundador do CC25 que também é um clone emergente na Europa, Ásia, África e EUA (RAFEI *et al.*, 2015). Segundo Karah *et al.* (2015), em adição à sua grande resistência aos antimicrobianos, as amostras classificadas como CC25 demonstram a capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas, e aderir às células epiteliais pulmonares dos alvéolos. O ST113 já foi descrito em amostras isoladas nos USA, China (site do Instituto Pausteur) e na África entre (2009 a 2010) (REVATHI *et al.*, 2013), Já a amostra n=14/ ST188 correspondente a um *Singleton*, que são STs que ainda não têm o número de inclusões suficientes para formar um complexo clonal (RAYANE *et al.*, 2104), no WEB SITE do instituto aparecem apenas duas inclusões de amostras, uma pertencentes ao Brasil e a outra do Japão, sendo este um dados epidemiológico interessante sobre este clone distinto.

Juntamente com as análises de polimorfismos a presença de quatro variantes da OXA-51. Os genes do tipo OXA-51 são onipresentes em *A. baumannii*, qualquer adaptação evolutiva nesta família, aumentará a atividade contra carbapenêmicos e a outras classes de antimicrobianos (Pounaras *et al.*, 2015). Segundo estudo realizado por June e colaboradores (2016), eles demonstraram que estas variantes possuem substituições do sítio ativo, e que algumas destas aumentam a atividade hidrolítica em relação aos antimicrobianos (June *et al.*, 2016). Não se sabe ao certo se são substituições ou mutações, porém os trabalhos publicados demonstram que o aparecimento destas variantes está associada a clínicas de *A. baumannii*, e que podem estar coligadas a um mecanismo de adaptação da espécie que sofreu pressão seletiva impulsionada pelo uso excessivo de carbapenêmicos que ocorreu principalmente na última década (Schroder *et al* 2016).

Em relação à avaliação pela técnica de FISH, houve uma perfeita visualização das células marcadas com o corante DAPI, porém não foi possível estabelecer uma correlação entre as células que hibridizaram com o DAPI e as sondas específicas usadas para detectar *A. baumannii*. Alguns fatores podem explicar este insucesso como: A questão da inacessibilidade da região alvo à sonda que esta intrinsecamente ligada à fase de fixação da amostra interferindo na qualidade do sinal de fluorescência que é considerada um dos principais complicadores para a aplicação de FISH; uma

permeabilização abaixo da ideal pode resultar em um baixo sinal; já uma permeabilização excessiva pode ocasionar a lise e perda de conteúdo celular (LAWSON *et al.*, 2011). Moter; Gobel (2000) citaram que, apesar da alta especificidade e sensibilidade dessa técnica, podem ocorrer erros, levando a resultados equivocados. O principal problema de resultados falso-positivos ocorre nos casos em que os micro-organismos ou substâncias alvos são autofluorescentes, tecidos contendo elastina e colágeno, como também eritrócitos ou eosinófilos, podem apresentar certa autofluorescência, conteúdos estes pertencentes à amostra analisada o mini-BAL, que podem explicar a detecção de falsos positivos.

A técnica de LAMP vem sendo utilizada como ferramenta para diagnóstico em várias doenças juntamente com a detecção de genes de resistência e para identificação de diversos micro-organismos, como *Leishmania* (KHAN *et al.*, 2012), *Toxoplasma gondii* (KONG *et al.*, 2012) e *Plasmodium vivax* (TAO *et al.*, 2011), incluindo os subtipos de influenza A H1N1 (NAKAUCHI *et al.*, 2011), o vírus H5N1 (DINH *et al.*, 2011), H7N9 (NAKAUCHI *et al.*, 2014), bem como *Mycoplasma pneumoniae* (GOTOH *et al.*, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (KUMAR *et al.*, 2014), Coronavírus vírus (POON *et al.*, 2004) e vírus da imunodeficiência humana (ZENG *et al.*, 2014), *A. baumannii* (CHENG *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016). Neste estudo houve sucesso na padronização da técnica para detecção do gene *bla*_{NDM-1}.

A New Deli metalo-beta-lactamase (NDM-1), foi descrita em 2009 em *K. pneumoniae*, é um novo tipo de metalo-beta-lactamase (MβL) pertencente a classe B Ambler (YONG *et al.*, 2009). NMD-1 foi pesquisada dentre os 44 micro-organismos isolados em mini-BAL por LAMP e seus resultados de amplificação foram correlacionados com os encontros em PCR, houve 100% de acurácia entre as duas técnicas, reafirmado que é uma técnica de detecção rápida e eficaz. A metodologia de LAMP apresenta diversas vantagens dentre as quais: a rapidez e facilidade na sua execução; a possibilidade de visualização do resultado por várias metodologias e a possibilidade de fazer a amplificação do DNA sem o uso dos termocicladores com uso de banho seco (NAGAMINE *et al.*, 2002; YONEYAMA *et al.*, 2007; MORI & NOTOMI, 2009).

Infelizmente para os outros iniciadores testados através da técnica de LAMP não houve sucesso na padronização da técnica, acredita-se que este insucesso seja devido aos iniciadores usados sendo necessário novos ajuste nestes, tendo que houve sucesso na padronização para o *bla*_{NDM-1}.

Existem outras metodologias para visualização dos resultados de LAMP que

foram testadas neste estudo. O *Hidroxi-naftol Blue* (HNB) é um reagente colorimétrico para íons de metais alcalinos terrosos. Na reação de LAMP, o HNB reage com os íons magnésio mudando a cor da reação de violeta (negativos) para azul (positivos) (GOTO *et al.*, 2009). Como o HNB é colocado antes de ocorrer a reação de amplificação, reduz a possibilidade de contaminação devido a elevada quantidade de cópias obtidas após a reação (NJIRU *et al.*, 2008). Porém não foi possível visualizar diferenças no padrão colorimétrico nas amostras, mesmo depois de fazer adequações em todo o protocolo utilizado diferentes quantidade de reagente por amostra ou aumento no tempo de corrida. Outra forma de observar os resultados de LAMP consiste na utilização de corantes fluorescentes intercalantes de DNA, como *SYBR Green* (TAO *et al.*, 2011). Com o uso do *SYBR Green*, através da visualização em UV, não houve correlação dos resultados encontrados em gel de Agarose com o emprego do intercalante, sendo a melhor metodologia para visualização dos resultados da técnica avaliada neste estudo, foi a corrida eletroforética com uso do gel de agarose a 1%.

Em todo o mundo, os métodos moleculares estão entre as técnicas de diagnóstico mais utilizado no contexto da pesquisa científica, porém ainda pouco empregados na rotina hospitalar (YEUNG *et al.*, 2015). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) torna-se uma técnica de grande praticidade, devido à possibilidade de ser realizada em diversos tipos de material biológico, como tecidos, sangue, fluidos corporais (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Outra vantagem é a possibilidade de detecção do DNA mesmo quando este se apresenta em quantidades mínimas nas amostras analisadas (SOUSA *et al.*, 2016). Diversos estudos demonstraram que a sensibilidade e especificidade desta técnica apresentam variações significativas, ocasionadas principalmente pelo iniciador direcionado a diferentes alvos moleculares, número de ciclos empregados na reação, métodos de extração do DNA e origem do material biológico (LAUCHAUD *et al.* 2002; BANETH 2008; MAIA *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2015).

Avaliou-se neste estudo a sensibilidade e especificidade das três gerações de PCR, de 1º geração (convencional), a de 2º geração (Real time ou qPCR) usando *SYBR® Green* e *TaqMan®*, e a de 3º Geração (droplet digital ou ddPCR), na detecção de *Acinetobacter baumannii* diretamente do espécime clínico de lavado bronco alveolar.

A avaliação da PCR convencional foi muito interessante, a técnica demonstrou uma boa sensibilidade e especificidade frente ao alvo testado. Sobre a amplificação das 44 espécimes de mini-BAL, houve uma correspondência de 75% com a cultura quantitativa e

duas ampliações amostra 41 e 50, ambas pertencentes a pacientes que estavam colonizados na pele e mucosas por *A. baumannii* no momento da coleta do mini-BAL, possivelmente detectamos o DNA de bactérias não viáveis com a técnica, uma vez que estas não cresceram em cultura quantitativa. Uma das desvantagens da técnica de PCR convencional é ser somente qualitativa, representando um limitante em nossa avaliação, pois não permite diferenciar pacientes infectados dos colonizados (ALYAPKINA *et al.*, 2000). Mas como vantagem permite a detecção do DNA nos tecidos do hospedeiro, sem necessitar passar pela etapa do cultivo microbiológico, o que torna o diagnóstico mais rápido em aproximadamente de 4 horas (YOON *et al.*, 1993).

PCR de segunda geração ou qPCR foi desenvolvido em 1992 como um aprimoramento da PCR original criada por Kary Mullis e representa um avanço significativo para o diagnóstico de doenças infecciosas (YOUNG *et al.*, 2009). O sistema é baseado no uso de corantes fluorescentes *SYBR® Green* ou sondas *TaqMan®*, que permitem o monitoramento do produto amplificado em tempo real (STRUELENS *et al.*, 2010).

Sobre as análises realizadas em qPCR utilizando o *SYBR® Green* foi obtida uma boa eficiência da reação de 98%. Houve uma baixa especificidade da técnica, tornando a quantificação questionável, porém quando se compara os resultados da amplificação da PCR convencional com os valores quantificados por *SYBR® Green* nota-se que houve um excelente correlação entre resultados. A baixa especificidade do *SYBR® Green* pode ser atribuída ao fato de este ser um agente intercalante do DNA, a detecção é monitorada através da intensidade de fluorescência ao longo dos ciclos, que pode ser uma das principais desvantagens do método, uma vez que o corante se intercala inespecificamente à dupla fita de DNA alvo ou em dímeros de *primers*, nas fases de anelamento e extensão da sequência alvo (HAAS *et al.*, 2016). Há outra hipótese para as ampliações inespecíficas, podem ser resultado da (ineficiência dos iniciadores).

O *TaqMan®* utiliza uma sonda fluorescente para permite a detecção de um produto específico conforme este se acumula durante os ciclos da qPCR. Uma sonda é construída contendo um corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um *Quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *Quencher* reduz bastante à fluorescência emitida pelo corante repórter através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço, utiliza uma sonda, específica para o gene de interesse, que é marcada com um fluoróforo repórter em uma extremidade e um fluoróforo “silenciador” (*Quencher*) na outra. Na forma íntegra, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo repórter é absorvida pelo

Quencher (HAAS *et al.*, 2016). Para o estudo optou-se em trabalhar com uma sonda com duplo *Quencher* a fim de aumentar a sensibilidade do método.

Observou-se que em relação à quantificação das amostras de mini-BAL usando *TaqMan*[®] a técnica se mostrou extremamente sensível podendo detectar valores em pentagramas de DNA entre as amostras, porém notou-se uma discrepância entre os valores quantificados. Alguns autores discutem que além da curva-padrão, a utilização de um gene normalizador para análise quantitativa pela qPCR é de extrema importância para se obter resultados confiáveis (PFAFFL, 2004; WONG & MEDRANO, 2005; MA *et al.*, 2006; BUSTIN, 2009).

As análises realizadas na 3^o geração de PCR a ddPCR a técnica se mostrou robusta, extremamente específica e muito sensível. Sobre a quantificação absoluta das 44 amostras de mini-BAL, obteve-se uma excelente correlação entre os resultados qualitativos/quantitativos de cultura, inclusive nas amostras do mini-BAL que foram negativas em cultura quantitativa. As vantagens da ddPCR em comparação com a qPCR em tempo real incluiu a quantificação absoluta sem a necessidade da construção de curvas padrão, possui maior precisão, menor interferência a inibidores da reação como os encontrados em amostras biológicas, maior poder discriminatório e reprodutibilidade (YANG *et al.*, 2017).

Análises estatísticas dos resultados das três gerações de PCR se fazem necessários, para se afirmar com certeza a superioridade até o presente momento demonstrada pela terceira geração a ddPCR.

12. *Sumário dos resultados e conclusão*

- No presente estudo foi identificado alto índice de amostras de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos, incluindo aos carbapenêmicos, fato que pode ser explicado pelo uso constante de antimicrobianos dessa classe nos esquemas terapêuticos adotados na instituição participante.
- O baixo número de amostras de *A. baumannii* recuperados pode ser devido ao uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro pela quase totalidade dos pacientes.
- A elevada mortalidade entre os pacientes incluídos no estudo corrobora com a literatura e reforça a importância de uma precocidade no diagnóstico etiológico da PAV.
- Variantes do marcador utilizado (*bla_{OXA-51}*), foram encontrados juntamente com suas inserções em quatro complexos clonais e um *Singleton* detectados pela técnica de MLST, sendo este um importante achado epidemiológico.
- Sobre a avaliação da técnica de FISH, não houve concordância dos resultados de fluorescência dos controles positivos com as sondas utilizadas na hibridização, necessitando de novas adequações no protocolo.
- Os protocolos de LAMP, utilizando o gene *bla_{OXA-51}*, *bla_{KPC-2}*, apresentaram resultados falso-positivos, mesmo após adequações nos mesmos e de testes com outros iniciadores.
- A técnica de LAMP foi eficiente na pesquisa de *bla_{NDM-1}* por LAMP concordando em 100% com os resultados da PCR convencional.
- Foi observada uma boa acurácia para técnica de PCR convencional, quando comparada aos resultados da cultura quantitativa e uma boa especificidade ao alvo testado.
- O *SYBR[®] Green* mostrou-se pouco específico, frente ao painel de bactérias testados, tornando os valores quantificados questionáveis.

- O *TaqMan*[®] demonstrou boa especificidade ao alvo testado, porém a quantificação das amostras de mini-BAL necessita-se de um gene normalizador na reação afim de verificar alguma mudança nos valores quantificados.
- A ddPCR, demonstrou uma excelente especificidade e sensibilidade ao alvo testado em relação a quantificação absoluta das amostras de mini-BAL e os resultados da cultura quantitativa, sendo possível estabelecer distinção entre os valores encontrados em pacientes colonizados por *A. baumannii*.

Através deste estudo verificou-se que não é necessário abandonar metodologias já consolidadas, reconhecidas como padrão ouro do diagnóstico de PAV, como cultura quantitativa, mais juntamente com estes agregar métodos de diagnóstico acurados é que produzam um resultado confiável em poucas horas é extremamente válido. FISH apesar de ser uma técnica robusta, demonstrou não ser adequada para o espécime clínico analisado. LAMP demonstrou ser uma técnica sensível e específica quando bem padronizada. Em relação a sensibilidade e especificidade das três gerações de PCR, obteve-se um resultado surpreendente com acurácia da PCR convencional quando estes resultados são correlacionados com a cultura quantitativa, demonstrou ser um boa ferramenta na detecção de *A. baumannii* em mini-BaL, com identificação do micro-organismo em aproximadamente quatro horas. A quantificação das amostras de mini-BAL pela ddPCR se mostrou superior aos da metodologia da qPCR, a técnica é nova porém vêm mostrando sua robustez, os resultados obtidos demonstraram que é uma técnica sensível e precisa e que sua aplicação como ferramenta de diagnóstico para detecção de micro-organismos causadores de PAV é aplicável, assim como a sua aplicabilidade para descalonamento da antibiótico terapia. Testes de validação do método se fazem necessário, porém com os resultados já obtidos se mostra extremamente promissora para melhoria do prognóstico de pacientes com PAV.

13. Apresentação de trabalhos e orientações

Evento: III Simpósio de Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte, MG.

Moreira, M.G., Mourão, L.M.B., Farias, L.M., Nobre Jr, V.A., Santos, S.G. Detecção de Beta-Lactamases do tipo NDM-1 usando a técnica de amplificação isotérmica mediada por LOOP em amostras clínicas de lavado broncoalveolar. 2016.

Evento: II Simpósio de Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte, MG.

Moreira, M.G.; Leão, A.C.A.; Novais, L.P.; Barreto, L.M.; Farias, L.M.; Nobre, V.; Santos, G.S. "Detecção de bactérias produtoras de carbapenemase do tipo *Klebsiella pneumoniae* (KPC) de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica. (PAV). 2015.

Evento: XII Fórum Internacional de Sepse, Institute de Sepse Latin American. São Paulo.

MOREIRA, M. G.; MOURÃO, L. M. B.; PEREIRA, L.; LEÃO, A. C. A.; FARIAS, L. M.; NOBRE, V.; SANTOS, S. G.; MOREIRA, M. G. Detecção de *Acinetobacter baumannii* por métodos moleculares de pacientes com pneumonia associada à sob ventilação mecânica, 2015.

Evento: XII Fórum Internacional de Sepse, Institute de Sepse Latin American. São Paulo.

MOREIRA, M. G.; MOURÃO, L. M. B.; PEREIRA, L.; FARIAS, L. M.; NOBRE, V.; SANTOS, S. G.; SANTOS, V. L.; MONTEIRO, A. S. Uso da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP) para detecção de *Acinetobacter baumannii* em pacientes com suspeita de pneumonia sob ventilação mecânica, 2015.

Evento: XIV Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia hospitalar. Curitiba, PR.

Mirna Giselle Moreira, Lídia Miranda Barreto Mourão, Gabriel Magno de Freitas Almeida, Samuel Viana Coelho, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Luiz de Macêdo Farias, Vandack Nobre, Simone Gonçalves dos Santos. Detecção de *Acinetobacter baumannii* por métodos moleculares de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV): resultados preliminares.2014.

Iniciação científica

Ana Claudia Leão. **Perfil microbiológico de amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica.** 2015. (Medicina) - Universidade Federal de Minas Gerais

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

Cássia Lopes Silva. **Avaliação genotípica de fatores de virulência de amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* recuperadas de hospitais de Belo Horizonte.** 2017. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Minas Gerais

14. Referências bibliográficas

ALKASABY NM, El SAYED Z M. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *International Journal of Microbiology*. 3925868. 2017.

ALYAPKINA YS, ROMANOVA YM, ALEEKSEEVA NV, KOVALEV YN, GAINTEVA AV, GINTSBURG AL. Development of a quantitative PCR technique and its application to the evaluation of gene expression. *Russ J Genet.* ;36:821–5.2000.

AMANN R I, LUDWIG W L, SCHELEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. 59 . 1995.

ANTUNES L.C.S.; VISCA, P.; TOWER, K.J. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71, 292–301. 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013. Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.4-150.

BANETH G; KOUTINAS A. F; SOLANO-GALLEGO L; BOURDEAU P; FERRER L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.

BARTUAL SG, SIEFERT H, HIPPLER C, LUZON MA, WISPLINGHOFF H, RODRIQUEZ V F . Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol. Sep*;43(9):4382-90.2005.

BAUMANN P, DOUDOROFF M, STANIER RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* ; 95:1520-41.1968.

BASSETTI, M.; MERELLI, M.; TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 12, p.12:22, 2013.

BEIJERINCK M W. Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. *Centr Bakteriol Parasitenk Abt* :167-76. 1911.

BORK, A; GASPAR, M,D,R; RECHE, P,M. Adherence to preventive measures for mechanical ventilator-associated pneumonia. Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. Ano V – V. 5 – N. 1 – 2015.

BOU, G. et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.*, v. 6, n. 12, p. 635-43, dec. 2000.

BOUGNOUX ME, MORAND S, ENFERT CD. Usefulness of Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical Isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* vol. 40 no. 4 1290-1297. 2002.

BRISOU J; PREVOT AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 86:722-8. 1954.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 1–3, 2006.

BUSH K, JACOBY GA. Update functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 59: 969-76. 2010.

BUSH, K, JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A,A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-33, 1995.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON GA, HELLEMANS, J, HUGGETT, J, KUBISTA M, MULLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 611–622.2009.

CAI Y, CHAI D, WANG R, LIANG B, and BAI N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1607–1615. 2012.
CAMARGO C H, TIBA M R, SAES M R, VANSCONCELLOS, SANTOS L F, ROMEROAND E C. . Population structure of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil: predominance of clonal complexes 1, 15 and 79. *ASM Journals*. 2015.

CARVALHO KR, CARVALHO-ASSEF APA, PEIRANO G, SANTOS LCG, PEREIRA MJF, ASENSI MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents.*; 34: 25-8. 2009.

CARVALHO CV, RICCI G, AFFONSO R. Guia de Práticas em Biologia Molecular. São Caetano do Sul: Ed. Yendis; p.61-98.2010.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 12, p. 4654-61, dec. 2004.

CHAGAS, T.P. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*, v. 111, n. 3, p. 572-81, sep. 2011.

CHARLES MP, KALI A, EASOW JM, JOSEPH NM, RAVISHANKAR M, SRINIVASAN S. Ventilator-associated pneumonia. *Australas Med J*. 7(8):334–44.2014.

CHIANG M C; KUO S C; CHEN Y C; LEE Y T; CHEN T L; FUNG C Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. v.44. n° 2, p. 106-110. 2011.

COELHO, F. Velhos problemas, novos desafios. *Revista Tecno Hospitalar*, v. 43, p.30 – 32. 2011.

COELHO, J.M. et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol*, v.44, n. 10, p. 3623-7, oct. 2006.

CORVEC S, CAROFF N, ESPAZE E., GIRAUDEAU C, DRUGEON H, REYNAUD A. . AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 629–635.2003.

DALLA-COSTA LM, COLEHO JM, SOUZA HAPH, CASTRO MÊS, STIER CJN, BRAGAGNOLO KL, REA-NETO A, PENTEADO-FILHO, SR, LIVERMORE DM, WOOFORD N. . Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil 3406.2003J. *Clin. Microbiol.* vol. 41 no. 7 3403-3406. 2003.

DOI Y, PARK YS, RIVERA JI, AdAMS-HADUCH JM, HINGWE A, SORDILLO EM, et al. Community-associated extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis*.2013.

ENRIGHT M C, DAY N P J, DAVIES C E, PEACOCK S J, & SPRATT B G Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008–1015.2000.

ESPINAL P, FUGAZZA G, LOPEZ Y, KASMA M, LERMAN Y, MALHOTRA-KUMAR S, GOOSENS H, CARMELI Y, VILA J. Dissemination of the NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5396–5398. 2012.

FEIL EJ, LI BC, AANENSEN DM, HANAGE WP, SPRATT BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186(5):1518-30.2004.

FIGUEIREDO S, et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter*

- baumannii* related to ISAbal-mediated overexpression of the natural 126 blaOXA-66 oxacillinase gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 2657-9, 2009.
- FOUNIER P E, RICHEL H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 42, 692–699.2006.
- GUIMARAES, Aline Caixeta et al . Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Rev. bras. enferm.**, Brasília , v. 64, n. 5, p. 864-869, Oct. 2011 .
- GOTOH M, HONDA E, OGURA A, NOMOTO A, HANAKI KI. Colorimetric detection of loop- mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **BioTechniques**, 46(3): 167–172. 2009.
- HAAS D J ; TORRES A C D .Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. Revista Científica de medicina veterinária - Ano XIV .Número 26 – Janeiro de 2016.
- HERITIER C, POIREL L, NORDAMAN P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 123–130. 2006.
- HIGGINS P G, POIREL L, LEHMANN M, NORDMANN P, SEIFERT H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5035–5038.2009
- HOOD, M. I., BECKER, K. W., ROUX, C. M., DUNMAN , P. M., and SKAAR, E. P. genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. **Infect. Immun.** 2013.
- HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY A.; SLEATOR, R.D. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen.**Virulence.** v.3, p.243-250, 2012.
- JACOBY G A, PRICE-MUNOZ L. The New β -Lactamases. *N Engl J Med*; 352:380-391. 2005.
- JANG I; MENG X; SEO H; CHO; Y K B; AYAYARU G; KIM J. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture** 287, 40–45.2009.
- JARDIM J M, LACERDA R A, SOARES N J D, NUNES B K. Avaliação das práticas de prevenção e controle de infecção da corrente sanguínea em um hospital governamental. *Rev. esc. enferm. USP* Sep 05; 47(1): 38-45.2017.
- JEON J, RYU C M, LEE J Y, PARK J H, YONG D, and LEE K. In vivo application of bacteriophage as a potential therapeutic agent to control OXA-66-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to sequence type 357. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4200–4208. 2016.
- JIN J S, KWON S O, MOON D C, GURUNG M, LEE J H, KIM S I, et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS ONE* 6:e17027. 2011.
- JUN S H, LEE J H, KIM B R, KIM S I, PARK T I, LEE J C, et al. . *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE* 8:e71751.2013.2013.
- LAN S B, GUNDI V A, KHAMINS A, RAOULT D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 827–832. 2016.
- LANDMANN, D. et al. Genetic relatedness of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. **Epidemiol Infect**, v. 137, n. 2, p. 174-80, feb. 2009. LARSON, E. Innovations in health care: antisepsis as a case study. **Am J Public Health.** 2009.

LACHAUD L., CHABBER T, E, DUBESSAY, P . Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. Pt 3, p. 197–207, 2002.

LEAN, S. S., SUHAILI, Z., ISMAIL, S., RAHMAN, N. I., OTHMAN, N., ABDULLAH, F. H., et al. Prevalence and genetic characterization of carbapenem and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from a tertiary hospital in Terengganu, Malaysia. **ISRN. Microbiol.** 2014.

LEE K, CHONG Y, SHIN HB, KIM YA, YONG D, YUM JH. Modified Hodge and disc synergy tests to screen metallo beta lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect.** v.7, p.88-91. 2001.

LEE Z; SHU-CHEN,A; MEI-CHIANG, A, E; SU-PEN-CHIEN,C, Su; PEI-CHEN, C; CHEN, T. Emergence of Carbapenem-Resistant Non-baumannii Species of *Acinetobacter baumannii* Harboring a blaOXA-51-Like Gene That Is Intrinsic. Division of Clinical Research, National Health Research Institutes,Taipei,e Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2012.

LEE, H.W.; KOH, Y.M.; LEE, J.C.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; KIM, J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.1, p.49-54, 2008.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4485-4491, 2005.

LEE C, JUNG H L, MOONHEE P, KWANG S P, KWON B, YOUNG B K, CHANG-JUN C, BYEONG C J, Sang Hee Lee. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options . **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7, 55.2017.

LIN M F, LAN C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. **World J. Clin. Cases.** 2, 787–814. 2014.

LIVEMORE D M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. Volume 14, Issue s1, 3-10. 2008.

LOPES C LE, CISNEROS JM, FERNANDEZ C F, BOU G, TOMÁS M, GARNACHO MONTERO J, PASCUAL A, MARTINEZ L, VILA J, PACHON J, RODRIQUEZ BANO J. Monotherapy versus combination therapy for sepsis due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: analysis of a multicentre prospective cohort. **J Antimicrob Chemother.** Nov;69(11):3119-26. 2014.

KALANURIA AA, ZAI W, MIRSKI M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. **Crit Care.** ;18:208.2014.

KANAMORI,H, PAROBK CM, WEBER DJ, VAN DUIN, RUTULA WA, CAIRINS BA, JULIANO JJ. Next-Generation Sequencing and Comparative Analysis of Sequential Outbreaks Caused by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at a Large Academic Burn Center. **Antimicrob Agents Chemother.** 7;60(3):1249-57. 2015.

KARAH N., HALDORSEN B., HEGSTAD K., SIMONSEN G. S., SUNDSFJORD A. SAMUELSEN et al. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. **J. Antimicrob. Chemother.** 2011.

KHAN FY, BAAGER MA. Nosocomial postneurosurgical *Acinetobacter baumannii* meningitis: a retrospective study of six cases admitted to Hamad General Hospital, Qatar. **Journal of Hospital Infection.** Volume 80, Issue 2, .Pages 176-179. 2012.

KIM C K, LEE Y, LEE H, WOO G J, SONG W, KIM M N, et al. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68, 432–438.2016.

KOLLEF MH. Review of recent clinical trials of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: a perspective from academia. **Clin Infect Dis.** Aug. v. 1, nº51 Suppl 1:S29- 35. 2010.

KROGER C, STEFANI C. Kary, SCHAUER K, CAMERON A D. S. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Genes* , 8, 12. 2017.

KULP A, and KUEHN M J . Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 163–184.2010.

KUYPERS K R J. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* June . 55- 6 . 2017.

MA H, SHIEH K.-J, CHEN G, QIAO XT, CHUANG M.-Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science* 2 (3).2006.

MAIA C; NUNES M.; CRISTÓVÃO J; CAMPINO L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta tropica**, v. 116, n. 3, p. 193–9, 2010.

MACKAY VL, et al. Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics: response of yeast to mating pheromone. *Mol Cell Proteomics* 3(5):478-89. 2004.

MARTINS HS, BOMFIM MR, FRANÇA RO, FARIAS LM, CARVALHO MA, SERUFO JC, SANTOS SG. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *Int J Environ Res Public Health.* Jan 28;11(2):1465-78. 2014.

MATHAI D, MANOHARAN A, VASANTHAN G. “Epidemiology and implications of ESBL,” in 1st Edn, Vol. 14, *Critical Care Update*, eds Nayyar V., Peter J. V., Kishan R., Srinivas S., editors. (New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.), 152–162.2009.

McCONNELL M. J., ACTIS L., PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 130–155. 2013.

MELO, E. M. Nursing care of hospitalised patients receiving mechanical ventilation in intensive care units. **Rev. Enf. Ref.**, Coimbra , v. IV, n. 1, março. 2014.

MOON D C, CHOI C H, LEE J H, CHOI C W, KIM H Y, PARK J S, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J. Microbiol.* 50, 155–160. 2012.

MOREIRA MG, CAMARGO CH, VASCONCELLOS FM, BARRETO LM, NOBRE V, SANTOS SG. Diversity of *bla*_{OXA-51} variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia. *J Glob Antimicrob Resist.* 9:94-95.2017.

MOTER A, GOBEL UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 41(2):85-112.2000.

NAGAMINE K, YASUOSHI M, TOMITA N, NOTOMI, T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Volume 289, Issue 1, Pages 150-154. 2001.

NAKAUCHI M., TAKAYAMA I., TAKAHASHI H., TASHIRO M., KAGEYAMA T. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. **J. Virol. Methods** 2014.

NEMEC A; KRIZOVA L; MAIXNEROVA M; VAN DER REIJDEN TJ, DESCHAGHT P, PASSET V, 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). **Res Microbiol.** May; v.162, n°4, p.393-404. 2011.

NEONAKIS I. K., SPANDIDOS D. A., PETINAKI E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 37, 102–109. 2011.

NOGUEIRA Jr C, MELLO DS, PADOVEZES MC, BOSZCZOWSKI I, LEVIN AS, LACERDA RA. Characterization of epidemiological surveillance systems for health care associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Cad Saude Publica.** 2014.

NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA,T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research,** 2008.

NOTOMI. T., OKAYAMA H., MASUBUCHI H., YONEKAWA. T., WATANABE. K., AMINO N., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.** 2000.

ODDS F, JACOBSEN M. . Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida* Species^o. *Eukaryotic Cell* vol. 7no. 7 1075-1084.2008.

OLAITAN A O, MORAND S, & ROLAIN J M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology,* 5, 643. 2014.

OLIVEIRA A, C; ANDRADE F, S; PISCOYA M, E; IQUIAPAZA R, A. Colonização por micro-organismo resistente e infecção relacionada ao cuidar em saúde. **Acta Paul Enferm.** v.25, n° 2, p.183-9. 2012.

PARIDA M, SANNARANGAIAH S, DASH PK, RAO PVL, MORITA K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique ; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev Med Virol,** 2008.

PEERAVEH, N; KARMOSTAJI, A. Molecular Identification of Resistance Determinants, Integrons and Genetic Relatedness of Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated From Hospitals in Tehran, Iran. **Jundishapur J Microbiol.** 2015.

PELEG A Y; SEIFERT H; PATERSON D L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.** Jul; v.21, n°.,3, p. 538-82. 2008.

PFAFFL MW. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter3. Quantification strategies in real-time PCR. 87-112. 2004.

PHETSUKSIRI B, RUDEEANESKIN J, SUPAPKUL P, SUKSAWAT W, MAHOTARN K, BRENNAN P. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens, *FEMS Immunology & Medical Microbiology,* Volume 48, Issue 3, 1, Pages 319–328. 2006.

PHILIPPART .F, et al. Decreased Risk of Ventilator-Associated Pneumonia in Sepsis Due to Intra-Abdominal Infection. **PLOS ONE.** September , 2015.

POIREL, L. NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J.D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v.44, p.891-897, 2000.

POIREL L, LAGRUTTA E, TAYLOR P, PHAM J, NORDAMANN P. Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrob Agents Chemother.** v.54, p. 4914-6. 2010.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D Beta-Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 24–38 v. 54, p. 24-38, 2010.

PRATES S C G; MARTINS A F; SUPERTI S V; LOPES F S; RAMOS F; CANTARELLI V V. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. **Epidemiol Infect.** v.139, n°3, p.411-8. 2011.

POUNARAS S, GAGOU V, DIMITROULIA E, DAFOPOULOU K, TSAKRIS A, ZARRILLI R. Single-Locus-Sequence-Based Typing of *bla*_{OXA-51-like} Genes for Rapid Assignment of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates to International Clonal Lineages. *J. Clin. Microbiol.* vol. 52 no. 5 1653-1657, 2014.

PUGH R, GRANT C, COOKE RPD, Dempsey G. Short-course versus prolonged course antibiotic therapy for hospital-acquired pneumonia in critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev.* ;(8).2015.

REMENTERIA, A. et al. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. **Clin Microbiol Infect**, v. v. 7, n. 6, p. 331-6, jun. 2001.

RESENDE J P, PAGANINI M C, VERONEZE Z, BURGARDT C I, SILVA M M G. Infecção e colonização por bactéria produtora de carbapenemase em paciente de um hospital terciário : Caracterização clínica e epidemiológica.. *Capa* > v. 2, n. 3 (2013)

ROCHA, LA, VILELA, CA, CEZÁRIO, RC, et.al. Ventilator-associated pneumonia in adult clinical surgical intensive care unit of a brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Braz J Infect Dis.** 2008.

RUMBO C, TOMAS M, FERNANDEZ M E, SAORES N C, CARVAJAL M, SANTILLANA E., et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect. Immun.* 82, 4666–4680.2011.

RUSSO T.A; MONOHAR A.; BEANAN J.M.; OILSON R.; MACDONALD U.; GRAHAM J.; UMLAND T.C. The Response Regulator BfmR Is a Potential Drug Target for *Acinetobacter baumannii*. *mSphere* 1, 00082-16. 2016.

SADER HS, CASTANHEIRA M, MENDES RE, TOLEMAN M, WALSH TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamase in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 25: 57-61. 2005.

SADEGHIFARD N, SALARI MH, GHASSEMI MR, ESHRAGHI S, AMIN H F. The incidence of nosocomial toxigenic *Clostridium difficile* associated diarrhea in Tehran tertiary medical centers. *Acta Med Iran.* 48:320–32. 2010.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed Field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984. SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 512-30, jul. 2006.

SILVA, R.C. G; SILVA, A. C. O; OLIVEIRA, S. R. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 50, n. 6, p. 421-427, Dec. 2014.

SILVA DUBOU SERAFIM, SOUZA, J, A, SOARES, J. C.; FORNO, N. L. F. Coleta de secreção traqueal: estudo comparativo de técnicas. . Saúde (Santa Maria), Santa Maria, Vol. 41, n. 1, Jan./Jul, p.57-64, 2015.

SINGH R, et al. Struct2net: integrating structure into protein-protein interaction prediction. *Pac Symp Biocomput* 403-14. 2006

SMANI Y, DOMINGUEZ-HERRERA J, PACHON J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* 208, 1561–1570. 2012.

SOARES S G S C, MASCARENHAS M D M, MOURA L N B, PEREIRA A F M P. Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. *Rev Enferm UFPI.* Abr-Jun;6(2):37-43.2017.

SOLANO-GALLEGO L; KOUTINAS A; MIRÓ G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

SOUDEIHA MAH, DAHDOUH EA, AZAR E, SARKIS DK, DAOUND Z. *In vitro* Evaluation of the Colistin-Carbapenem Combination in Clinical Isolates of *A. baumannii* Using the Checkerboard, Etest, and Time-Kill Curve Techniques. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* ;7:209. 2017..

STRUELENS MJ, MONNET DL, MAGIORAKOS AP, SANTOS O'Connor F, GIESECKE J. European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: Emergence and response in Europe. **Euro Surveill.** v.15.p. 197-200. 2010.

TAN X, ZHU S, YAN D, CHEN W, CHEN R, ZOUJ, YAN J, ZHANG X *Candida* spp. Airway colonization: A potential risk factor for *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **Med Mycol.** 2016.

TAO L, HU B, ROSENTHAL V D, GAO X, HE L. Device-associated infection rates in 398 intensive care units in Shanghai, China: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings. *International Journal of Infectious Diseases.* Volume 15, Issue 11, Pages e774-e780. 2011.

TAVANTI A, DAVIDSON AD, HOHNSON EM, MAIDEN MCJ, SHAW D, GOW NA R. ODDS FC. Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Strains of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* vol. 43 no. 11 5593-5600.2005.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, sep. 1995.

TIAN, G.B. et al. Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 10, p. 4922-5, oct. 2011.

TOLEMAN, M.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 5, p. 673-9, nov. 2002.

TRAGLIA G M, QUINN B, SCHRAMM S T, SOLER-BISTUE A, and RAMIREZ M S. Serum Albumin and Ca²⁺ Are Natural Competence Inducers in the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4920–4929. 2016.

TURTON J F, WOODFORD N, GLOVER J, YARDE S, KAUMAFMANN M E, PIIT T. L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin Microbiol.* 44, 2974–2976. 2006

- VALI, Leila et al. "Diversity of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii* Population in a Major Hospital in Kuwait." *Frontiers in Microbiology* 6 (2015): 743. *PMC*. Web. 11 Sept. 2015.
- VAN DEN BROEK, P.J. et al. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol*, v.47, p. 3593-3599, 2009.
- VASHISTT J; TIWARI V; KAPIL A; MOGANTY R, R; ESPINAL A, S. Differential expression of Outer membrane proteins in early stages of meropenem-resistance in *Acinetobacter baumannii*, **JIOMICS**. v, 1, n° 2, p. 280-286. December 2011.
- VYNCKA M, VANDESOPPELE J, NIJIS N, METENB B, GANCK D, THAS O. Flexible analysis of digital PCR experiments using generalized linear mixed models. *Biomolecular Detection and Quantification* 9 -1–13. 2016.
- WATSON, JD; MYERS, RM; CAUDY, AA; WITKOWSKI, JA. DNA Recombinante – Genes e Genomas, 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- WONG ML, MEDRANO JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 38: 75-85.2005.
- WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 4, p. 351- 3, apr. 2006..
- YANG, H; Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 and blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Clin Exp Med**. 2015.
- YANG Q; XI J; CHEN X; HU S; CHEN N; QIAO S; Wan S; Bao D. The development of a sensitive droplet digital PCR for quantitative detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Int J Biol Macromol**. Jun 30;104. 2017.
- YANG B; SONG X; HUANG J; SHI C; LIU Q; LIU L. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J. Fish Dis*. 29, 301–305.2009.
- YEUNG, S.W. et al. Evaluation of an in-house real-time polymerase chain reaction method to identify group B streptococcus colonization in pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v.41, n.9, p.1357-1362, 2015.
- YOON HS, LEE SU, PARK KY, PARK KY. . Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. 1993vol. 35 no. 1 228-232. 1993.
- YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDAMAN K, LEE K. Characterization of new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**. v.53, p. 5046-54. 2009.
- Yoshimura Jumpei, Kinoshita Takahiro, Yamakawa Kazuma, Matsushima Asako, Nakamoto Naoki, Hamasaki Toshimitsu, Fujimi Satoshi. Impact of Gram stain results on initial treatment selection in patients with ventilator-associated pneumonia: a retrospective analysis of two treatment algorithms. *Critical Care*. 21:156.2017
- ZAVASCKI AP, CARVALHAES CG, PICAIO RC, GALES AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**. Jan; v.8, n°.1, p.71-93. 2010.



Letter to the Editor

Diversity of *bla*_{OXA-51} variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia



Sir,

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a condition that especially affects patients in the intensive care unit (ICU). *Acinetobacter baumannii* is an important micro-organism associated with this disease, with a negative impact on patient morbidity and mortality [1].

The main mechanism of resistance to β -lactam agents in *A. baumannii* is the production of β -lactamases, although several other mechanisms contribute to a multidrug-resistant (MDR) phenotype in these bacteria [2].

Carbapenem resistance in *A. baumannii* has predominantly been driven by the carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases (oxacillinases). There are currently five major subclasses of oxacillinase (OXA) associated with *A. baumannii* strains: acquired OXA-23-like; OXA-24/40-like; OXA-58-like; OXA-143-like; and intrinsic OXA-51-like. The *bla*_{OXA-51} gene is normally located on the chromosome and has been used as a marker for species identification, although its presence has already been detected in other species within the genus [2]. It is known that these enzymes have been under considerable selective pressure due to antibiotics; however, there have been few studies of these enzyme variants and their performance with regard to antimicrobial resistance [1,2].

We aimed to characterise the *bla*_{OXA-51}-like variants as well as the clonal complexes of MDR *A. baumannii* strains isolated from clinically identified VAP patients in a public general university hospital in Belo Horizonte (Minas Gerais State, Brazil).

From November 2013 to July 2015, patients aged ≥ 18 years admitted to the ICU who had received mechanical ventilation for ≥ 48 h and presenting symptoms related to VAP were considered for potential eligibility in this study. This study was approved by the Research Ethics Committee of the participating hospital. The obtained clinical specimens were analysed by quantitative culture. Isolated bacteria were identified and their minimum inhibitory concentration (MIC) profile was determined using a VITEK[®]II system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

The main oxacillinase groups (OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like and OXA-143-like) were searched using PCR. Identification of *bla*_{OXA-51} subtypes was done by sequencing of *bla*_{OXA-51}-like alleles. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) were used to characterise the strains [3,4].

A total of 44 patients (23 male and 21 female) with a mean age 61 ± 19 years were included. *A. baumannii* strains were isolated in seven patients (16%).

A. baumannii strains showed multiple resistance profiles. All of them were resistant to β -lactams (including carbapenems), ciprofloxacin and piperacillin/tazobactam and 57% were resistant to gentamicin.

The *bla*_{OXA-51}-like gene was detected in all *A. baumannii* strains. Four *bla*_{OXA-51}-like subtypes were identified by sequencing the entire gene: *bla*_{OXA-60} ($n = 3$); *bla*_{OXA-65} ($n = 1$); *bla*_{OXA-64} ($n = 1$); and *bla*_{OXA-132} ($n = 1$) (Table 1). The *bla*_{OXA-23}-like gene was found in 86% of strains (6/7) and *bla*_{OXA-143}-like in 29% (2/7) (Table 1). The *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} genes were not detected.

Seven pulsotypes were found among the seven *A. baumannii* strains by PFGE, with 64% overall similarity. MLST analysis/eBURST identified the sequence type (ST)/clonal complex (CC) ST1/CC1 in three of seven strains; on the other hand, ST113/CC25, ST15/CC15, ST79/CC79 and ST188/singleton were detected in one strain each (Table 1). ST1/CC1 strains were assigned into International Clone (IC) I.

These findings showed a great polymorphism among MDR *A. baumannii* strains. Seven of the strains were composed of five different STs, four clone complexes (CC15, CC25, CC79 and CC1) and one singleton (ST188). According to Martins et al. [4], in a study of clinical strains from eight Brazilian states, CC79 was prevalent among *A. baumannii* strains, followed by CC1 associated with *bla*_{OXA-69}. This study reported the presence of a singleton ST188 with only two inclusions within the Institut Pasteur website, in association with *bla*_{OXA-132} [4]; however, the association of a singleton and the variant of OXA-51 had not previously been reported, which is worthy of note. ST15 is considered a rapid clonal expansion, being reported in Brazil in clinical strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil [5].

The presence of *bla*_{OXA-143} appears to be restricted to Brazil, belonging to CC1 and CC25, which, in association with *bla*_{OXA-143}, is considered to be emerging in the country [5]. Further to its high resistance to antibiotics, CC25 demonstrates the ability to form biofilms and to adhere to epithelial cells of the alveoli, which is important in VAP patients [1,5].

Owing to the small number of *A. baumannii* strains isolated in this study, it was difficult to find a statistical correlation between the STs and their association with OXA-51 variants and endemicity [4,5]. It is known that therapeutic use of carbapenems promotes the co-evolution of *bla*_{OXA-51} sequences as part of the genome of *A. baumannii*, which results in the appearance of diverse OXA-51 variants [1–3].

The occurrence of strains with *bla*_{OXA-23}-like genes belonging to CC1 (IC1), CC15 and CC79 confirms the diversity of these clones in Brazil. At the same time, the occurrence of strains with a *bla*_{OXA-143}-

Table 1
Results of analysis of multilocus sequence typing (MLST) and OXA-51 variants in *Acinetobacter baumannii* strains.

Strain identification	OXA allele	OXA-51 allele	MLST (Institut Pasteur)							
			ST	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rpIB</i>	CC ^a
5	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
9	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
10	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	69	1	1	1	1	1	5	1	CC1
14	<i>bla</i> _{OXA-143-like} <i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	132	188	1	3	6	1	3	4	Singleton
26	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-143-like}	64	113	3	3	3	4	7	4	CC25
34	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	65	79	26	2	2	2	29	4	CC79
35	<i>bla</i> _{OXA-51-like} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	51	15	6	6	8	2	3	5	CC15

^a Clonal complex (CC) determined by eBURST analysis (<http://eburst.mlst.net/>).

like gene in CC25 alerts to the possible establishment of this until now emerging lineage.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq/UFMG).

Competing interests

None declared.

Ethical approval

In accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council, approval for this study was obtained from the Research Ethics Committee of UFMG [CAAE 23476313.6.0000.5149].

Acknowledgements

The authors thank the laboratory personnel from the participating hospital as well as Prof. Luiz de Macêdo Farias (Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil) for their technical support. The authors also thank the team of curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and/or isolates at <http://www.pasteur.fr/mlst>.

References

- [1] Chang HC, Chen YC, Lin MC, Liu SF, Chung YH, Su MC, et al. Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Formos Med Assoc* 2011;110:564–71.
- [2] Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:241–63.
- [3] Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefaniik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4328–35.
- [4] Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VB, Coelho-Souza T, et al. Imported and intensive care unit-born *Acinetobacter baumannii* clonal

complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. *Microb Drug Resist* 2013;19:216–23.

- [5] Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, Vasconcelos FM, Santos LF, Romero EC, et al. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of donal complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2545–7.

Mirna G. Moreira
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

Carlos H. Camargo
Francieli M. Vasconcelos
Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

Lidia M. Barreto^{a,b}
^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

^bHospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

Vandack Nobre
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

Simone G. Santos*
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

* Corresponding author. Present address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, CEP: 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2761; Fax: +55 31 3409 2730.
E-mail address: simonesantoskey@icb.ufmg.br (S. Santos).

Received 31 October 2016

Available online 26 April 2017

15.2. Artigo II



5-Aug-2017

Dear Dr Santos,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Rapid detection of the New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)" in its current form for publication in Journal of Clinical Laboratory Analysis. The comments of the referee(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Professor Junming Guo
Editor-in-Chief, Journal of Clinical Laboratory Analysis
guojunming@nbu.edu.cn

Referee(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author
The manuscript has been revised well.

Title page

Rapid detection of the New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Mirna Giselle Moreira¹, Lidia Miranda Barreto², Vera Lúcia dos Santos¹, Andrea Souza Monteiro³, Vandack Nobre⁴, Simone Gonçalves dos Santos¹

Running title: Rapid detection of the New Delhi metallo- β -lactamase 1

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

² Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina /UFMG. Belo Horizonte - MG, Brazil.

³Departamento de Parasitologia e Biologia, Centro Universitário do Maranhão, São Luís, Brasil.

⁴Programa de Pós Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil

Corresponding author:

Prof. Simone Gonçalves dos Santos, PhD, Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P. 486, Pampulha - Campus UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil Tel: +55 31 3409-2761. E-mail: simonesantosey@ufmg.br

ABSTRACT

Background

New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM-1) is an enzyme emerging around the world conferring resistance to a wide range of β -lactams agents and whose early detection is extremely important.

We proposed to standardize the detection of the *bla*_{NDM-1} gene using the LOOP-mediated isothermal amplification technique (LAMP).

Methods

14 Gram negative bacterial strains isolated from patients presenting pneumonia associated to mechanical ventilation were used to the *bla*_{NDM-1} standardization by LAMP. *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2473 and two clinical strains were used as a positive control. All results were compared to the reaction in Polymerase Chain Reaction (PCR), considered gold standard for this detection.

Results

There was an excellent correlation between the two techniques employed, since all measured clinical strains were negative in both employed tests and two clinical, and a reference strains were positive.

Conclusions

The lamp technique seems to be an excellent option for the rapid detection of *bla*_{NDM-1}. The amplification time is much shorter than other molecular techniques, the PCR machine is not necessary, it is easy of implementation and costs is low.

Keywords: New Delhi metallo-b-lactamase1, loop-mediated isothermal amplification

1. INTRODUCTION

The New Delhi metallo-lactamase (NDM-1) gene encodes an enzyme that hydrolyzes and inactivates some drugs conferring resistance to a wide range of β -lactams, including penicillins, cephalosporins and carbapenems [1]. The gene is plasmidial, with its presence described in many bacteria of the family *Enterobacteriaceae* and non-fermenting Gram negative rods in most continents around the world, becoming an important public health problem worldwide due to its impact Clinical and economic [2,3]. Although the exact geographical origin and the precise moment for the appearance of the *bla*_{NDM-1} gene are unknown, the first clinical sample carrying this gene was recovered in 2009 from a Swedish patient who previously (2007) had an episode of

hospitalization in the city of New Delhi, India [4]. Subsequently Kumarasamy et al. [5] showed the presence of the *bla*_{NDM-1} gene in *Enterobacteriaceae* in India, Pakistan, the United States and the United Kingdom. Although highly sensitive molecular diagnostic methods have been proposed, they remain expensive and laborious and require technical training, as well as specific facilities and equipment, making it difficult to use them in routine hospital clinical laboratories [6,7]. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a new technique for the specific amplification of nucleic acids [8]. LAMP overcomes some of the drawbacks and limitations of PCR and has been widely used in the diagnostic testing of infectious agents. The method is very specific due to the use of six primers that identify eight regions of the target sequence. The sensitivity of the method for detection of target sequences is 10 times higher than PCR. The reaction time of LAMP is shorter than PCR because LAMP is carried out isothermally (60-65°C) and the amplified product is observable without electrophoresis. In addition, LAMP is less expensive than other molecular diagnostic methods because it does not require a thermal cycler [9]. Therefore, in view of the epidemic relevance of the presence of *bla*_{NDM-1}, the aim of this study was to standardize a rapid molecular diagnostic technique for this gene using the LAMP technique due to its low cost and easy execution.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bacterial strains

To evaluate the specificity of the LAMP assay for detecting *bla*_{NDM-1}, a total of 14 bacterial strains isolated from bronchoalveolar lavage of patients with suspected pneumonia associated with mechanical ventilation. All strains included in this study were positive to different β -lactamases genes, and it was previously evaluated for the *bla*_{NDM-1} presence by PCR (Table 1).

The *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2473 and two clinical isolated strains, NDM-1 producers (*K.pneumoniae* and *Providencia stuartii*), were used as positive controls.

Table 1- Clinical bacteria isolated from patients with pneumonia associated to mechanical

ventilation used to LAMP evaluation and the conditions of PCR reactions.

Bacterial species evaluated	β -lactamases genes searched by PCR	References used to β -lactamases PCR tests	Detection of <i>bla</i> _{NDM-1}	
			PCR	LAMP
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51/23}	(Turton, 2006 ¹⁰ ; Dalla, 2003) ¹¹ (Dahl, 1999) ¹²	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51/143}	(Turton, 2006 ¹⁰ ; Higgins, 2010) ¹⁴	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	(Jones, 2009) ¹³	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}	(Turton, 2006) ¹⁰	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51/23}	(Turton, 2006 ¹⁰ ; Dalla, 2003) ¹¹	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51/143}	(Dalla, 2003) ¹¹ ; Higgins, 2010) ¹⁴	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}	(Turton, 2006) ¹⁰	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	(Dalla, 2003) ¹¹	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	(Pak, 2015) ¹⁵	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	(Pak, 2015) ¹⁵	+	+

2.2. LAMP assay

The LAMP reaction was carried out using Kit Bst 2.0 DNA Polymerase (BioLabs, New

England) in a 25µl volume reaction [8, 16]. The reaction mixture contained a set of 6 primers, viz., 2 inner primers (FIP and BIP, 50 pmol of each), 2 outer primers (F3 and B3, 50 pmol of each), and 2 outer primers on a loop primer (LB, LF 50 pmol), which would accelerate the LAMP reaction; the mixture contained 2.5 µl of 10X buffer, 1 µl of Bst DNA polymerase (8 units), 0.8 µl of FIB, 0.8 µl of BPI, 0.1 µl of F3, 0.1 µl of B3, 0.4 µl of LB, 0.4 µl of LF, 3.5 µl of dNTPs, 2 µl of MgCl₂, 5.4 µl de milliQ water, and 4 µl of DNA template. The LAMP reaction was performed under isothermal conditions, at 60°C, for 45 min and was then terminated at 80°C for 5 min.

2.3. Primer design

Candidate LAMP primer sets were designed from the nucleotide sequences of *bla*_{NDM-1} (GenBank accession numbers KX999121-1) using Primer Explorer V4 software (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) (Table 2).

Table 2. LAMP primers used in this study

Assay	Primer	Sequence (5`-3`).
<i>bla</i> _{NDM-1}	BIP	TCTGGGCGCTCTGGTCATCGTTTTTTTCCAACGGTTIGATCGTCA
	FIP	GAGATCAACCTGCCGGTCGTTTTTTCCATACCGCCCATCATCTTGT
	FP	ACCACCAGCACGCGGCCGCCATC
	LB	GGTGACTCACGCGCATCAGG
	B3	CTTCCTATCTCGACATGCGG
	F3	GCATAAGTCGCAATCCCCG

2.4. DNA extraction

Total bacterial DNA was extracted by thermal lysis. For this, after growth in tryptic soy agar for 18 hours, the isolated bacterial colonies were inoculated into 200 µl of 1% Phosphate Buffered Saline (PBS) solution, homogenized and centrifuged at 4°C for 10 minutes; then, the supernatant was discarded and 200µl of 1% TE (1M Tris-HCl pH 8.0 1 ml) was added to the solution, which was boiled for 15 minutes and then centrifuged at 4°C for 15 minutes at 12,000 rpm. This was the procedure reported by Martins et al. [17] with modifications.

2.5. Determination of the sensitivity of LAMP assay

To determine the sensitivity of the *bla*_{NDM-1} positive LAMP assay for *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2473, serial dilutions of reference strain DNA were used (0.5 ng/μl, 5 ng/μl, 50 ng/μl, and 500 ng/μl), as described previously. PCR amplification was performed to allow for sensitivity comparison, with a final volume of 25μl containing 12.5μl of master mix (Promega®), 1μl of forward primer and 1μl of reverse, 1μl of DNA and 9.5μM water; the running conditions were previously reported [18]. The products amplified by LAMP and PCR were electrophoresed on a 1% agarose gel, stained with gelRed and visualized under UV light.

3. Results

3.1. Conditions assessed for LAMP *bla*_{NDM-1} standardization

We identified the optimal temperature for efficient LAMP-based amplification by incubating the reaction mixture at 60-69 °C. Measurements showed that the optimal temperature for amplification was 60 °C. It also analyzed the amplification time, 45 minutes being the best for the reactions. The final concentration of the reagents and other parameters used for the reaction are shown in section 2.2.

3.2. Specificity of NDM-1 LAMP

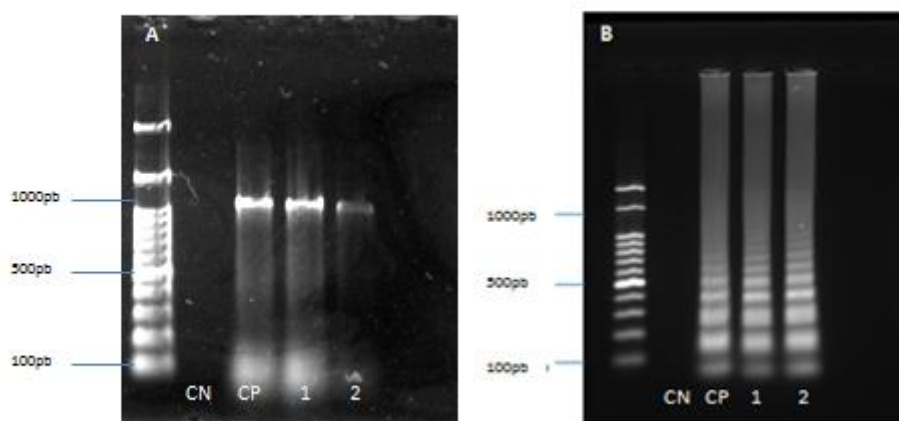
We evaluated the specificity of the LAMP assay for detecting *bla*_{NDM-1} producers by assessing its reactivity with strains producing other types of β-lactamase. As shown in Table 1, we observed that the LAMP assay specifically amplified DNA from NDM-1 producers, but not from any of other type of β-lactamase and the negative control (distilled water). The accuracy of this amplification was confirmed by sequencing the amplified products using the internal primers. The sequences obtained were identical to the expected nucleotide sequences from *bla*_{NDM-1}. Thus, the assay was highly specific for detecting *bla*_{NDM-1}.

3.3. Sensitivity of NDM-1 LAMP

The sensitivity of the LAMP assay for the detection of *bla*_{NDM-1} was determined. Through the serial dilutions test of DNA extracted from *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2473 cultures, the results were compared using PCR tests. The results showed that the LAMP assay is capable of detecting the target gene even from 5 ng/μl, whereas the PCR assay was able to amplify the gene

from 5 ng/μl. Thus, the LAMP assay demonstrated the same sensitivity as the gold standard technique, but with a much shorter amplification time (Figure 1).

Figure 1. Representative images of agarose electrophoresis gel of PCR and LAMP reactions for *bla*_{NDM-1} evaluation.



(A) PCR for *bla*_{NDM-1} (B) LAMP for *bla*_{NDM-1}. CN-negative control; CP-positive control; 1-*K.pneumoniae* strain; 2-*Providencia stuartii* strain.

DISCUSSION

Since its discovery in 2008, New Delhi Metallo-β-lactamase-1(NDM-1)-producing *Enterobacteriaceae* has been spread globally, facilitated predominantly by intestinal colonization. It is believed that fecal-oral transmission plays an important role on it, by food, water and hand contamination [19]. Asian continent serves as the major reservoir of NDM producers, with around 58.15% abundance of NDM-1 variant distributed mostly in China and India [20]. Europe shows around 16.8% of the total producers, with the maximum spread of NDM-1 variant in Bulgaria, Romania, Poland, France, Italy, Turkey, Germany, Greece, Serbia, London, Ukraine, Croatia, Azerbaijan and Ireland [20]. American continent shows around 10.8% abundance of the total NDM-

1 producers as reported globally, of which subcontinent Brazil serves as the major reservoir [20].

In addition, the antimicrobial choice for NDM-1 positive bacteria is limited and requires a weighted risk and benefit analysis of the available agents [21]. NDM-1-producing microorganisms often carry other resistance enzymes including ESBL and AmpC β -lactamases, making the most of the available antibiotics inactive [13]. These findings confirmed the need for improvements in sanitary conditions such as a public health intervention, rapid diagnostic tests and easy execution [14].

The LAMP technique is considered as an excellent amplification and detection technology demonstrating many advantages when compared with traditional detection methods [22]. The LAMP assay is from 10 to 100 times more sensitive than PCR, with a detection limit of 10 copies, moreover with the DNA can be amplified 10^9 - 10^{10} time between 30 and 60 minutes, and can save up to 1 hour when compared to the PCR reaction [23]. Several authors confirm this increased sensitivity and advantages of LAMP. Zhao and colleagues optimized the *Escherichia coli* detection in food samples to 100 fg of DNA in 45 minutes as a detection limit. Xu et al. (2016) [24] used LAMP to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from bronchoalveolar lavage, demonstrating at least 10-fold greater sensitivity and detection time when purchased from PCR.

In Brazil, New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) was detected for the first time in 2013, in a *Providencia rettgeri* strain, in the south of the Country [25]. Since then several reports have been recorded in other states of Brazil, in different strains as *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli* [26, 27, 28, 29]. However, this is not yet one of the most prevalent β -lactamase genes in Brazil [30].

The gold standard for the identification of carbapenemase producers and for the specific detection of *bla*_{NDM-1} are molecular techniques [13]. This study demonstrated the efficacy and sensitivity of using the LAMP technique for the detection of positive samples For NDM-1. When carbapenemase is suspected, PCR is the fastest way to detect these genes, with techniques such as real-time PCR and commercial DNA arrays (Check Points) being useful alternatives [31]. Although

these tests are specific and show high sensitivity, they depend on expensive equipment and expertise in analyzing the results. LAMP is a technique that can be performed without the use of thermocyclers, the amplification time is much shorter than other molecular techniques, with the benefit of not losing its sensitivity and specificity, low cost and easy execution can be an excellent epidemiological surveillance tool, especially in endemic countries.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank Dr. James Key for the English evaluation of this paper.

DISCLOSURE STATEMENT

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:5046–5054.
- 2- Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10:832.
- 3- Tran HH, Ehsani S, Shibayama K, Matsui M, Suzuki S, Nguyen MB et al. Common isolation of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae* in a large surgical hospital in Vietnam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:1247–1254.

4-Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo--lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:5046–5054.

5- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krish nan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10:597– 602.

6- Rho J, Ryu JS, Hur W, Kim CW, Jang JW, Bae SH, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotyping by annealing reverse transcription-PCR products with genotypespecific capture probes. *J Microbiol* 2008; 46:81–7.

7- Duarte CA, Foti L, Nakatani SM, Riediger IN, Poersch CO, Pavoni DP, et al. A novel hepatitis C virus genotyping method based on liquid microarray. *PLoS One* 2010; 5 (9).

8- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T; Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28 (12): e 63.

9- Bakhtiari S, Alvandi A, Pajavand H, Navabi J, Najafi F. Development and Diagnostic Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using a New Gene Target for Rapid Detection of *Helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(5): e 28831.

- 10- Turton J F, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann M E, Pitt T L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*_{OXA-51-like} Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. Clin. Microbiol. August 2006; 44 (8) 2974-2976.
- 11- Dalla-Costa L M, Coelho J M, Souza H A P H M, Castro M E. S, Stier C J N, Bragagnolo K L, Rea-Neto A, Pentead-Filho S R, Livermore D M, Woodford N. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. J. Clin. Microbiol. July 2003; 41 (7) 3403-3406.
- 12- Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1999. 43(5):1105–1110.
- 13- Jones, C H, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Braford P A. Characterization and sequence analysis o extended-spectrum- β -lactamaseencoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. Antimicrob agents chemother.2009, 465-475.
- 14- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int. J. Antimicrob. Agents. 2010, 35:305.
- 15- Pak-Leung H, Zhen L, Wai-U L, Yuk-Yam C, Chi-Ho L, Pak-Chung S, Vincent C.C, Chen, Tak-Keung, Tak-lun, Kin-Hunh. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying *bla*_{NDM-1} in *Enterobacteriaceae* isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. Emerging Microbes and Infections. 2012. 12 (7).

- 16- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223.
- 17- Martins, H S I, Bomfim, M R Q, França, R O, Farias, L M, Carvalho, M A R, Serufo, J C, Santos, S G. Resistance Markers and Genetic Diversity in *Acinetobacter baumannii* Strains Recovered from Nosocomial Bloodstream Infections . *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, 11(2), 1465–1478.
- 18- Wang X, Hao Q, Yang X, Yang X, Xiao X, Luan C, Yang Y, Cui Y, Yang R, Gao GF, Song Y, Zhu B. Novel plasmid and its variant harboring both a blaNDM-1 gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:1698 – 1702.
- 19- WJ W, Yang HF, Ye Y, Li JB New Delhi Metallo- β -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chin Med J (Engl)*. 2015; 20;128 (14):1969-76.
- 20- Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*. 2017;17:101.
- 21- Rogers BA, Sidjabat HE, Silvey A, Anderson TL, Perera S, Li J, . Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 2013;19:100-3.
- 22- Sheet O H, Grabowski N T, Klein G. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis milk samples *Mol. Cell. Probes*, 30 (5) (2016), 320–325.

- 23- Yanmei L, Penghui F, Shishui Z, Li Z. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens, *Microbial Pathogenesis* 2017, 54–61.
- 24- Xu Z, Y. Hou, D Q. Evaluation of Current Methodologies for Rapid Identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* Strains. The International Conference on Biotechnology and Bioengineering, icbb (2016).
- 25- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2956–2957.
- 26- Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2014;25:79–81.
- 27- Quiles M G, Rocchetti T T, Fehlberg L C, Kusano E J U, Chebabo A, Pereira R M G, Gales A C, Pignatari A C C. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2015).
- 28- Pereira PS, Borghi M, Albano RM, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist.* 2015;21(2):234–236.
- 29- Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, et al. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for *bla*_{NDM-1} dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7387–7395.
- 30- Sampaio J L M, Gales A C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian journal.* 2016. 7.
- 31- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases.

Trends Microbiol 2011;19:588-95.