

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE EM
AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii* OBTIDAS DE UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

PRISCILA SIMÃO COSTA

Belo Horizonte

2017

PRISCILA SIMÃO COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE EM AMOSTRAS DE
Acinetobacter baumannii OBTIDAS DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM
BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Prof. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Co-Orientadores: Prof. Dr. Vandack Nobre

Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Dissertação de Mestrado

Defesa da dissertação de mestrado de Priscila Simão Costa, intitulada:
**“CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE EM AMOSTRAS DE
Acinetobacter baumannii OBTIDAS DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM
BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS”**, orientada pela Professora Simone
Gonçalves dos Santos, apresentada à banca examinadora em 23 de fevereiro de
2017.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

_____ .

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos- ICB/UFMG - Orientadora

Dra. Mireille Ângela Bernardes Sousa - Hermes Pardini

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli- ICB/UFMG

Belo Horizonte

2017

COLABORAÇÃO

Prof. Ricardo Gonçalves

Laboratório de Patologia das Leishmanioses do Departamento de Patologia Geral do
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Prof. Vandack de Alencar Nobre Júnior

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias e Ciências da
Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

Dra. Cristina Dutra Vieira

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Gabriella Freitas Ferreira

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Governador Valadares

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me mostrar o caminho certo e as pessoas certas. Por ser a minha fortaleza e o meu ponto de equilíbrio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Ercília e José Geraldo, que me ensinaram que a educação é aquilo que um ser humano pode receber de mais precioso na vida. Por sempre me acompanharem e me ajudarem em todos os momentos, apostando sempre na minha capacidade. Tenham certeza que vocês são os responsáveis pela pessoa que eu sou, e é claro, por essa conquista. Meus mais sinceros agradecimentos!

À minha família, meus irmãos, que sempre me amparam em todas as situações, sendo compreensivos com minha falta de tempo, e acima de tudo me apoiaram em tudo que eu precisei. À minha prima Gabriela, que se tornou meu porto seguro e é a responsável por tantas mudanças na minha vida, especialmente no quesito humanidade.

À minha orientadora, Dra. Simone, pela preocupação, conselhos, orientação e infinito apoio durante todos estes anos em que tenho desenvolvido pesquisa no MOA, sendo sempre gentil e presente. Obrigada pela confiança que depositou em mim, como ser humano e como profissional.

Aos Professores Luiz Macedo e Paula Prazeres, responsáveis pelo laboratório, obrigada pela atenção, apoio e carinho comigo, e com todos que fazem parte dessa família que é o MOA.

Aos meus amigos integrantes e ex-integrantes do MOA: pela convivência diária e pelos ensinamentos adquiridos com cada um. Em especial à Mirna, Anna Gabriella, Silvinha e Cássia, que ajudaram para que esse trabalho fosse realizado. Gratidão imensa a vocês!

Aos meus colegas de trabalho, que fazem do meu dia uma alegria diária, que estão sempre presentes nas discussões acerca das dúvidas e sempre dispostos a me ajudar. Obrigada pela convivência e apoio. Eu amo todos vocês!

Às minhas companheiras do MOA, que se tornaram verdadeiras amigas e hoje fazem parte de mim, Amanda e Cássia. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias acerca desse trabalho e da vida. Quero levar essas amizades pra vida toda!

Aos meus amigos dos outros laboratórios do Departamento de Micro: Rafa, Léo, Hellen, Marliete, Juliana, Thaís, pelas dicas, pelo apoio e prontidão em me ajudar. Em especial ao Sávio, que me ajudou muito com a parte de bioinformática.

À Tassiane, pelo apoio, ajuda, paciência, disposição, atenção, carinho, amizade, preocupação e ensinamentos, especialmente pelas madrugadas que tivemos que passar no lab! Saiba que sem você esse projeto seria impossível! Você é uma pessoa maravilhosa que quero sempre manter por perto. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos do lab de Patologia, que me receberam com grande carinho: Tamara, Greg, Glauber e Vitor, pelas dicas, orientação e amizade, pelo convívio e pelo incrível apoio e ajuda nos momentos mais críticos, em especial na parte *in vivo* e análises de resultados.

Ao meu co-orientador, Dr. Ricardo, por estar sempre à disposição para me ajudar e ensinar algo, sempre prestativo e com boa vontade. Gratidão pelos momentos em que se dispôs a me orientar em tudo que eu precisei, inclusive nos experimentos de bancada. Você é um professor e ser humano incrível!

Ao meu co-orientador Vandack, pela disposição em ajudar e tamanho carinho e atenção com este trabalho, especialmente no que se referem aos dados clínicos e estatísticos desse estudo. Sua colaboração foi essencial!

Aos meus colaboradores: Dra Viviane, pelos experimentos com *C. elegans*, e a professora Gabrielle pelos experimentos com potencial zeta. Obrigada pela colaboração e disponibilidade.

À Dra. Cristina Dutra, pelo apoio, carinho e pelas análises estatísticas, além da imensa disposição e prontidão em me dar apoio.

À todas as agências de fomento, em especial à Capes, pelo apoio financeiro.

Por fim, sinto-me feliz e realizada por ter chegado onde nunca pensei ser capaz, mas com a certeza de ter sido verdadeira, humilde e perseverante na realização do meu trabalho, tenho o sentimento de dever cumprido. A todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho, MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - IRAS e a problemática da resistência ..4	
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.2.1 Características gerais	7
2.2.2 Importância clínica e epidemiológica	8
2.2.3 Resistência de <i>A. baumannii</i> aos antimicrobianos.....	10
2.2.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>A. baumannii</i>	11
2.2.4.1 Produção de beta-lactamases	11
2.2.4.2 Alteração da permeabilidade da membrana	14
2.2.4.3 Sistemas de efluxo.....	15
2.2.5 Fatores de patogenicidade	16
2.2.5.1 Fímbrias.....	17
2.2.5.2 Cápsula.....	18
2.2.5.3 Formação de biofilme.....	20
2.2.5.4 Vesículas de membrana externa.....	21
2.2.5.5 Sistema de <i>quorum sensing</i>	24
2.2.5.6 Indução de morte celular em células do hospedeiro.....	26
2.2.5.7 Resistência ao estresse oxidativo	31

3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	OBJETIVOS.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	Etapa clínica.....	35
5.1.1	Delineamento do estudo e caracterização dos pacientes.....	35
5.1.2	Variáveis consideradas na inclusão das amostras.....	35
5.1.3	Aspectos éticos do estudo.....	35
5.2	Etapa laboratorial.....	36
5.2.1	Amostras bacterianas.....	36
5.2.2	Deteção de genes associados à patogenicidade.....	36
5.2.3	Extração de DNA genômico e preparo do Master-mix.....	37
5.2.4	Condições de amplificação e análise dos produtos amplificados por PCR.....	37
5.3	Deteção fenotípica de fatores de patogenicidade.....	40
5.3.1	Avaliação da patogenicidade em macrófagos por linhagens de <i>A. baumannii</i>	40
5.3.2	Avaliação de apoptose em macrófagos por citometria de fluxo.....	42
5.3.3	Avaliação de fagocitose por macrófagos em citometria de fluxo.....	43
5.3.4	Avaliação de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo.....	44
5.3.5	Avaliação da tolerância ao peróxido de hidrogênio por disco-difusão.....	45
5.3.6	Avaliação da atividade hemolítica.....	45
5.3.7	Mensuração do potencial Zeta.....	46
5.4	Análises estatísticas.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Perfil clínico e demográfico dos pacientes do estudo.....	48
6.2	Deteção de genes associados à patogenicidade.....	49
6.3	Deteções fenotípica de fatores de patogenicidade.....	51
6.3.1	Avaliação de morte celular induzida por linhagens de <i>A. baumannii</i>	51
6.3.2	Avaliação de apoptose em macrófagos por citometria de fluxo.....	54
6.3.3	Avaliação de fagocitose por macrófagos em citometria de fluxo.....	55

6.3.4 Avaliação da tolerância ao peróxido de hidrogênio por disco-difusão.....	57
6.3.5 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo	59
6.3.6 Avaliação da atividade hemolítica	61
6.3.7 Potencial Zeta	61
7 DISCUSSÃO	63
8 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	76
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10 ANEXOS	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil genotípico de fatores associados à patogenicidade das amostras clínicas de *A. baumannii*

Gráfico 2 - Frequência dos genes relacionados à patogenicidade e suas combinações (n=29)

Gráfico 3 - Densidade celular após a infecção de macrófagos com linhagens de *A. baumannii*, representando as amostras das quais se observou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem inóculo bacteriano)

Gráfico 4 - Densidade celular após a infecção de macrófagos com linhagens de *A. baumannii*, representando as amostras das quais se observou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência.

Gráfico 5 - Taxa de fagocitose das amostras de *A. baumannii*

Gráfico 6 - Média do tamanho dos halos de inibição nas quatro concentrações testadas

Gráfico 7 - Média do tamanho dos halos de inibição para as trinta amostras testadas

Gráfico 8 - Comparação da média dos halos das amostras clínicas com significância estatística ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606

Gráfico 9 - Taxa da produção de ROS pelos macrófagos

Gráfico 10 - Potencial zeta de membrana das linhagens de *A. baumannii*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de morte celular induzidas por infecções bacterianas

Figura 2 - Morte celular avaliada por coloração com IP e anexina A5

Figura 3 - Infecção de macrófagos BMDM por *A. baumannii* em lamínulas de vidro após 24h de infecção.

Figura 4 - Análise de apoptose induzida em macrófagos por *A. baumannii* através da citometria de fluxo

Figura 5 - Análise de Fagocitose por citometria de fluxo

Figura 6 - Teste do estresse oxidativo e respectivas concentrações de peróxido de hidrogênio (1%, 5%, 10% e 20%)

Figura 7 - Análise da produção de ROS por citometria de fluxo

Figura 8 - Teste de hemólise em placas de ágar-sangue. (A) Ágar-sangue de carneiro. (B) Ágar-sangue humano tipo AB positivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de bases, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de determinantes genéticos de fatores de patogenicidade.

Tabela 2 - Frequência das comorbidades apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 3 - Perfil de internação dos pacientes do estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Ampicilina-Sullbactam
AIF	Fator indutor de apoptose
AHL	N-acil-homoserina lactona
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobiano(s)
BHI	<i>Brain Hearth Infusion</i>
BE	Bile Esculina
BGN	Bastonetes Gram-negativos
BMDM	Macrófagos derivados da medula óssea
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHDL	<i>Carbapenem-hydrolyzing class D β- lactamases</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFSE	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CFDA-SE	Succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína
CTZ	Ceftazidime
DAMP	Padrão(s) molecular(s) associado(s) à danos
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EUA	Estados Unidos da América
EPS	Matrix exopolissacarídica
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-lactamase(s)</i>
FACS	Citometria de fluxo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FBS	Soro Fetal Bovino
GM	Gentamicina

GES	<i>Guiana extended-spectrum</i>
GIM	<i>German imipenemase</i>
HC-UFMG	Hospital das clínicas da UFMG
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICS	Infecção(s) da Corrente Sanguínea
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IH	Infecção Hospitalar
ITU	Infecção do Trato Urinário
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecção(s) Relacionada à Assistência a Saúde
IRC	Insuficiência renal crônica
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LPS	Lipopolissacáride
LB	Luria-Bertani
MFS	Principal superfamília facilitadora
MDR	Multidroga resistente
Mcg	Micrograma(s)
mg	Miligrama(s)
Mm	Milímetro (s)
MP	Meropenem
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDM	<i>New Delhi Metallo–betalactamase</i>
MR	Multirresistente
NMC-A	<i>Not metalloenzyme carbapenemase</i>
IMI	<i>Imipenemase</i>
MTT	Methyl thiazolium tetrazolium
OMP	Proteína(s) de membrana externa
OMV	Vesícula de membrana externa
OXA	Oxacilinase(s)
PAMP	Padão (s) molecular(s) associado(s) à patógenos
PBP _s	<i>Penicilin Binding Proteins</i>

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PO	Polimixina B
QS	<i>Quorum sensing</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RND	Família resistência-nodulação-divisão
RT-PCR	<i>Real time-Polimerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIM-1	<i>Seoul imipenemase</i>
SME	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
SOD	Superóxido dismutase
SPM	São Paulo metalo-betalactamase
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TGC	Tigeciclina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UDP	Uridina difosfato
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	<i>Verona imipenemase</i>

RESUMO

Nos últimos anos *Acinetobacter baumannii* tem se tornado um micro-organismo de grande importância clínica e epidemiológica. Isso se deve à sua usual resistência, intrínseca e adquirida, a vários antimicrobianos, além de sua habilidade de sobrevivência em diversos ambientes, por longos períodos de tempo. As habilidades de invasão, colonização e de destruição tecidual apresentada por linhagens desta espécie devem-se aos múltiplos fatores de patogenicidade encontrados neste micro-organismo durante a sua patogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar fatores de patogenicidade presentes nesta espécie, por meio de análises fenotípicas e genotípicas. Foram incluídas 29 amostras de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos, obtidas de pacientes com infecções diversas, atendidos em um hospital universitário de Belo Horizonte no período de agosto de 2012 a maio de 2013, além da amostra de referência, *A. baumannii* ATCC 19606. A presença de genes associados à cápsula, biofilme, apoptose e *quorum sensing* (QS) foram pesquisados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o ensaio de apoptose, fagocitose e de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizou-se Kits específicos e análises por citometria de fluxo. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada pelo método de disco difusão com peróxido de hidrogênio. O teste de hemólise foi executado em 06 tipos sanguíneos diferentes (humano, carneiro e cavalo), sendo os de origem humana de fator Rh positivo. Todas as amostras positivas para *gaiU* e 76% para *wzc*. No que se refere a *quorum sensing*, 10% das amostras apresentaram o gene *luxI* e 7% *luxR*. Todas as amostras foram positivas para *bap*, relacionado à formação de biofilme. Em relação às porinas, 14% foram positivas para *omp33* e 31% para *ompA*. 24% das amostras apresentaram todos os genes pesquisados relacionados à patogenicidade. Nos ensaios em citometria de fluxo, exceto uma amostra, todas induziram a formação de ROS por macrófagos em diferentes taxas. Na fagocitose, todas as amostras foram fagocitadas, porém também em diferentes taxas. Na indução de apoptose em macrófagos por linhagens de *A. baumannii*, foram 08 amostras cuja incubação resultou em significativa redução no número de macrófagos em relação ao controle, já em relação à amostra de referência, somente duas amostras. No que concerne estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, 20 amostras obtiveram significância estatística ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência, 06 foram mais sensíveis, e 14 mais resistentes. No

potencial zeta, apenas 03 amostras apresentaram valores significativamente mais eletronegativos ($p < 0,05$) que o da ATCC. Por fim, no ensaio de produção de hemolisinas, nenhuma amostra apresentou atividade hemolítica nos 06 tipos sanguíneos avaliados. Os dados deste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular desta espécie, bem como o de alguns fatores de patogenicidade, que têm sido pouco descritos no Brasil, permitindo assim reforçar o monitoramento e implementar medidas de controle.

Palavras chave: *Acinetobacter baumannii*, patogenicidade, apoptose, macrófagos, ROS, fagocitose.

ABSTRACT

In recent years, *A. baumannii* has become a microorganism of great clinical and epidemiological relevance. This importance is due to its extraordinary ability to present resistance, both intrinsic and acquired, to several antimicrobials, besides its ability to survive on the environmental surfaces for long time. Moreover, the pathogenic ability of this species including invasion, colonization and tissue destruction results from multiple virulence factors produced by this microorganism. The objective of this study was to evaluate virulence factors present in this species, through phenotypic and genotypic analyzes. Twenty-nine samples of antimicrobial multiresistant *A. baumannii* obtained from patients with various infections admitted to a teaching hospital in Belo Horizonte from 2012 to May 2013 were included, in addition to the reference sample, *A. baumannii* ATCC 19606. The presence of capsule-associated genes, biofilm, apoptosis and quorum sensing were investigated by the polymerase chain reaction (PCR) technique. For the apoptosis, phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) assay, specific kits and flow cytometric analyzes were used. The evaluation of oxidative stress was carried out by the disc diffusion method with hydrogen peroxide. The hemolysis test was performed on 06 different blood types (human, sheep and horse), being those of human origin of factor Rh positive. All samples were positive for *gaiU* and 76% for *wzc*. Concerning quorum sensing, 10% of the samples had the *luxI* gene and 7% *luxR*. All samples were positive for *bap*, related to biofilm formation. Regarding OMPs, 14% were positive for *omp33* and 31% for *ompA*. 24% of the samples presented all virulence related genes. In ROS and phagocytosis production assays in flow cytometry, except for one sample, all induced the formation of ROS by macrophages at different rates. In phagocytosis, all samples were phagocytosed, but at different rates. In the induction of apoptosis in macrophages by *A. baumannii* lines, there were 08 samples which incubation resulted in a significant reduction in the number of macrophages in relation to the control, but in relation to the reference sample, only two samples. In relation to oxidative stress by hydrogen peroxide, 20 samples had statistical significance ($p < 0.05$) in relation to the reference sample, 06 were more sensitive, and 14 were more resistant. At the zeta potential, only three samples presented significantly more electronegative values ($p < 0.05$) than the reference sample. Finally, in the hemolysin production assay, no sample

had hemolytic activity in the 06 blood types evaluated. The data of this study are relevant to public health, since they allow the knowledge of the molecular epidemiology of this species, as well as some virulence factors, which have been little described in Brazil, thus allowing to reinforce the monitoring and to implement control measures.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, virulence, apoptosis, macrophages, ROS, phagocytosis.

1 INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um grave problema de saúde pública em âmbito mundial, especialmente em países em desenvolvimento, sendo reconhecidas por terem impacto sobre a letalidade, morbidade e nos custos sociais e econômicos para os sistemas de saúde. Dessa forma, as IRAS constituem preocupação constante, emergindo como um dos maiores desafios da medicina atual (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). A realização de procedimentos invasivos, diagnósticos ou terapêuticos, a contaminação de dispositivos artificiais, a difícil implementação de técnicas básicas de controle de infecção e a prevalência de micro-organismos resistentes a múltiplas antimicrobianos são fatores que têm contribuído significativamente para o aumento dessas infecções (SILVA et al., 2015).

Atualmente, muitos patógenos clinicamente importantes são resistentes a grande parte dos antimicrobianos disponíveis. Além disso, algumas bactérias geralmente consideradas menos patogênicas são capazes de sobrepujar a deficiente resposta imunológica dos pacientes mais debilitados, podendo causar graves doenças infecciosas (ABBOTT et al., 2013, HILTUNEN et al., 2017). Em 2009 a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) inseriu o acrônimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies de *Enterobacter*), que é a lista de micro-organismos que mais ameaçavam e, ainda ameaçam, a segurança dos pacientes e preocupam os sistemas de saúde (BOUCHER et al., 2009, SINGH et al., 2017)

Em um estudo de Santos et al. (2014) realizado em um hospital público geral de grande porte, no interior do Paraná, identificou-se que, de janeiro a dezembro de 2012 o hospital contabilizou 96 registros de IRAS na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para adulto, sendo que a unidade manteve, no mesmo período, 351 pacientes internados. Com isso, a prevalência global de IRAS foi de 27,35% com uma proporção de infecção por paciente internado de quase 1:4. No que diz respeito ao agente etiológico, identificou-se que 22 (22,95%) doenças infecciosas ocorreram por *Acinetobacter* sp.; 20 (20,83%) por *P. aeruginosa*; 17 (17,71%) por outros bacilos Gram-negativos (BGN); 10 (10,42%) por *S. aureus* e 27 (28,13%) das IRAS tiveram

outros agentes etiológicos como causa, ou não havia identificação da espécie do micro-organismo nos registros.

Nesse contexto, *A. baumannii* tem se destacado como um importante patógeno oportunista, responsável por grande porcentagem das IRAS e também por surtos hospitalares (WONG et al., 2017).

A habilidade de *A. baumannii* sobreviver nos mais diversos locais, incluindo superfícies secas e inanimadas, aliado aos seus mais diversos mecanismos de patogenicidade, contribui para sua permanência no meio hospitalar. A sua versatilidade metabólica e nutricional também pode influenciar na sua proliferação em enfermarias e entre os pacientes. Além disso, nas últimas décadas, linhagens dessa espécie vêm se tornando rapidamente multirresistentes a diversos agentes antimicrobianos, facilitando sua disseminação e persistência no ambiente hospitalar por longos períodos (GALLEGO, 2016).

Segundo a literatura, *A. baumannii* possui mecanismos que facilitam a colonização dos pacientes e de equipamentos usados no atendimento médico. Algumas linhagens podem aderir e penetrar em células epiteliais humanas através de fímbrias ou cadeias laterais de lipopolissacarídeos, além de formar biofilme em contato com superfícies abióticas, de plástico ou vidro, sendo essa última propriedade de especial relevância clínica pela ocorrência de infecções vinculadas ao uso de cateteres (MAMPRIM et al., 2016). Em um estudo realizado por Viana et al. (2016) avaliou-se a recuperação de bactérias resistentes da superfície de colchões de pacientes sob precauções de contato, em um hospital universitário em Belo Horizonte. Dos 51 colchões avaliados, 51% tinham bactérias resistentes em sua superfície, sendo a espécie *A. baumannii* a predominante dos isolados (69,2%).

Em outro estudo de Evangelista et al. (2015), investigou-se a microbiota presente em instrumental cirúrgico após o uso clínico, seguintes aos protocolos de limpeza manual e automatizada, em um hospital universitário de Minas Gerais. Observou-se que, apesar da limpeza manual mostrar-se mais eficiente do que a automatizada, o instrumental ainda continha inúmeros micro-organismos, sendo o complexo *A. baumannii* um dos mais recuperados. Dessa forma, confirma-se a resistência desse micro-organismo aos mais diversos ambientes e condições.

Al-Anazi e Al-Jasser (2014) afirmam que dentre as infecções mais frequentes relacionadas a este micro-organismo estão a pneumonia associada à ventilação mecânica e a infecção da corrente sanguínea. Além disso, infecção do trato urinário associada ao uso de cateter, assim como as infecções de tecidos moles, principalmente com a presença de queimaduras e trauma, também são epidemiologicamente relevantes. Existem ainda, relatos de outras infecções como meningite, endocardite e infecções gastrointestinais, associadas a este micro-organismo.

As estratégias de melhorias no quadro dos surtos de IRAS causadas por *A. baumannii* passam por diversas abordagens, mas fundamentalmente por programas de prevenção e controle de infecção de caráter multidisciplinar. Além disso, durante os surtos é crucial o estabelecimento rápido de estratégias de intervenção, a qual institui diversas medidas, como uma vigilância ativa de todos os pacientes, fechamento de UTI's para novas admissões, bem como a avaliação e uma possível descontaminação do ambiente (MOLTER et al., 2016).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese de *A. baumannii* pode ser útil para compreender o tipo de interação que esse micro-organismo tem com o paciente, bem como o entendimento da evolução das doenças causadas por ele. Além disso, devido à relevância da crescente recuperação de amostras de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos nas IRAS e às habilidades dessa espécie em sobreviver no ambiente, confirma-se a relevância deste trabalho. Dessa forma buscou-se ampliar o conhecimento a respeito de alguns fatores de patogenicidade apresentados por *A. baumannii*, sob o ponto de vista fenotípico e genotípico, a fim de encontrarmos algum mecanismo que possa ter importante papel na colonização, infecção e propagação epidêmica das amostras clínicas incluídas neste estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - IRAS e a problemática da resistência

As IRAS são definidas como toda e qualquer infecção adquirida durante o processo de cuidados de saúde, seja em instituições hospitalares ou fora do âmbito hospitalar, seja o cuidado terapêutico ou diagnóstico (GOMES et al., 2014). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2013) acrescenta ainda que, para ser considerada IRAS, a infecção não deve estar presente ou encontrar-se em incubação no momento da admissão do paciente. Entretanto, esses quadros podem se manifestar após a alta hospitalar.

As IRAS representam um grande problema na atualidade, não somente para as autoridades de saúde competentes, mas também por questões de ordem social, ética e jurídica, devido às implicações na vida dos usuários e dos serviços de saúde. Estas infecções podem aumentar os custos assistenciais de saúde, dentro de uma perspectiva econômica, incluindo aquela dos administradores de hospitais, dos prestadores de serviços terceirizados e dos próprios pacientes. O custo excessivo pode estar relacionado com a realização de testes diagnósticos adicionais, com a terapêutica utilizada no tratamento, com o aumento do tempo de internação hospitalar devido às complicações resultantes, dentre outros fatores (PADOVEZE e FORTALEZA, 2014).

Segundo Santos et al. (2016), fatores intrínsecos e extrínsecos são preditores de vulnerabilidade para ocorrência de IRAS. Dentre os fatores intrínsecos estão a gravidade da doença, estado nutricional e a idade avançada, este último diretamente relacionado com o estado imunológico do paciente. Por outro lado, dentre os fatores extrínsecos, o mais expressivo é o período de internação, pois quanto maior o tempo de permanência hospitalar, mais exposto ficará o paciente à população de micro-organismos nosocomiais.

Em relação às IRAS, a problemática é ainda mais relevante nas UTI's. É neste local que é fornecido o apoio necessário aos pacientes com doenças potencialmente graves, permitindo uma constante monitoração, que propicia a identificação e

tratamento oportuno das intercorrências médicas. Entretanto, é especialmente neste setor que os pacientes são mais expostos aos riscos de IRAS, seja devido à sua condição clínica, ao uso de imunossupressores ou à diversidade de procedimentos invasivos realizados. (PEREIRA et al., 2016). Neste contexto, salientam-se as técnicas invasivas praticadas na grande maioria dos pacientes internados em UTI que, por abrirem vias de acesso aos tecidos estéreis do organismo, favorecem a entrada de potenciais patógenos, sendo este um fator de risco para a ocorrência de IRAS (WINTER et al., 2013).

No que se refere à epidemiologia brasileira, dados de um estudo de vigilância nacional, denominado de “Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica” (*Brazilian SCOPE*), foram utilizados para determinar a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea (ICS) nosocomiais em 16 hospitais brasileiros. Neste estudo, 2.563 pacientes com ICS nosocomial foram avaliados de 2007 a 2010, sendo 95% destas infecções monomicrobianas. Os micro-organismos Gram-negativos causaram 58,5% destas ICS, os Gram-positivos 35,4%, e os fungos foram responsáveis por 6,1%. Os patógenos mais comuns (em infecções monomicrobianas) foram *S. aureus* (14%), *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa (12,6%), *Klebsiella* spp. (12,0%) e *Acinetobacter* spp. (11,4%). Neste estudo multicêntrico, foram encontradas altas proporções de ICS nosocomiais relacionadas à micro-organismos resistentes a antimicrobianos. Entre as amostras de *Klebsiella* spp. 54,9% eram resistentes a cefalosporinas de terceira geração. Já em relação aos Gram-negativos não fermentadores, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, 55,9% e 36,8%, respectivamente, eram resistentes ao imipenem (MARRA et al., 2011).

Um estudo realizado em um hospital universitário brasileiro entre 2009 e 2011 concluiu que dentre os micro-organismos isolados de culturas positivas em pacientes com IRAS, *K. pneumoniae* foi o mais prevalente, tanto nos casos de alta (19,0%), como nos de óbito (21,2%). O segundo micro-organismo mais frequente nos pacientes que evoluíram a óbito foi *A. baumannii* (18,5%); já entre os que receberam alta, *P. aeruginosa* teve índice de 11,3%. Dessa forma, as bactérias Gram-negativas foram destaque na epidemiologia das IRAS. Ademais, estudos mostram taxas de mortalidade por bactérias Gram-negativas significativamente mais elevadas em pacientes com IRAS, variando de 41,2% a 68,0% (SOUZA et al., 2015).

A prevalência da resistência aos antimicrobianos é uma preocupação global. Países da América Latina, como o Brasil, têm taxas maiores de resistência bacteriana entre os seus principais micro-organismos envolvidos nas IRAS, quando comparadas com a Europa e os Estados Unidos da América, particularmente dentro do grupo dos bastonetes Gram-negativos não-fermentadores e espécies produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL); além de micro-organismos Gram-positivos, como *S. aureus* (ANDRADE, 2008). Gales et al. (2012) verificaram a frequência de resistência aos antimicrobianos em Gram-negativos na América Latina. No estudo, as taxas de *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenem aumentaram de 6,4%, 12,6% e 0,0% no período de 1997-1999 para 84,9%, 71,4% e 50% em 2008-2010 na Argentina, Brasil e Chile, respectivamente.

Martins et al. (2014) avaliaram a resistência entre amostras de *A. baumannii* recuperadas da corrente sanguínea em diferentes hospitais em Minas Gerais, no período de 2008-2009. Foram encontradas altas taxas de resistência aos carbapenêmicos (93,75%), bem como à polimixina B (39,06%). Ademais, 60,9% das amostras isoladas foram positivas para a presença de oxacilinases e 93,75% para metalo-beta-lactamases. Usando uma metodologia de agrupamento de linhagens relacionadas observou-se um mesmo padrão genético entre amostras de diferentes hospitais, o que indicou uma circulação de clones entre os hospitais estudados.

Diante do exposto, conclui-se que o controle das IRAS é essencial para minimização do tempo de internação do paciente e, por conseguinte, redução dos custos e da utilização de antimicrobianos devido às altas taxas de linhagens resistentes (SANTOS et al., 2014).

Apesar de existirem antimicrobianos de uso restrito na grande parte dos hospitais, sua prescrição pode ser prejudicada devido ao atraso dos diagnósticos de microbiologia, o que conseqüentemente leva a uma alta pressão seletiva devido ao uso empírico e, muitas vezes inadequado, de antimicrobianos de largo espectro (FURTADO et al., 2010).

2.2 *Acinetobacter baumannii*

2.2.1 Características gerais

Atualmente o gênero *Acinetobacter* está inserido no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gamma proteobacteria, ordem *Pseudomonadales*, família *Moraxellaceae* (EUZÉBY, 2016). Este gênero é representado por cocobacilos Gram-negativos, não fastidiosos, imóveis, catalase positivos e oxidase negativos. São estritamente aeróbios, sendo incapazes de fermentar carboidratos para obtenção de energia (VIEIRA; PICOLI, 2015). São capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono. O teste de oxidase permite a identificação presuntiva do gênero *Acinetobacter*, contribuindo para a diferenciação do grupo de outros micro-organismos não fermentadores (JOSHI; LITAKE, 2013).

No que diz respeito à morfologia, apresentam-se como bastonetes curtos e espessos, com diâmetro de 1,0 a 1,5 μ m e comprimento de 1,5 a 2,0 μ m na fase exponencial de crescimento, tornando-se cocobacilares durante a fase estacionária (ABBOTT et al., 2013). As espécies de *Acinetobacter* de origem humana multiplicam-se bem em meio sólido como Ágar sangue de carneiro, ou *Tryptic Soy Agar* (TSA), incubadas à temperatura de 37°C. A temperatura ótima de crescimento é de cerca de 30 a 35°C, mas podem se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 20 a 44 °C. Em meio TSA elas formam colônias lisas, algumas vezes mucóides, acinzentadas ou amarelo-pálidas, com diâmetro de 1,5 a 3,0mm, após 24 h de incubação a 37°C. Algumas espécies, como *A. haemolyticus*, apresentam atividade hemolítica (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

O gênero *Acinetobacter* atualmente contém 42 espécies nomeadas (EUZÉBY, 2016). O Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* inclui quatro espécies geneticamente muito semelhantes e dificilmente distintas fenotipicamente: *A. calcoaceticus* (com predominância ambiental e limitada relevância clínica), *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, sendo estas três últimas espécies de elevada significância clínica, especialmente em infecções nosocomiais (DEXTER et al., 2015).

As espécies que fazem parte desse gênero são ubíquas, estando amplamente distribuídas em ambientes naturais, como solo e água, sendo frequentemente

encontradas colonizando seres humanos. Poucos estudos abordam a dispersão das espécies no ambiente. *A. calcoaceticus* está presente na água, solo e em vegetais. *Acinetobacter johnsonii* na água, solo, em vegetais, na pele e em fezes de humanos. *A. Iwoffii* e *A. radioresistens* na pele humana e *Acinetobacter* espécie genômica 11 é observado na água, solo, em vegetais e no trato intestinal de seres humanos. Algumas espécies são reconhecidas como importantes micro-organismos patogênicos e frequentes em surtos nosocomiais, associados à resistência a diversos antimicrobianos, como *A. pittii* e *A. nosocomialis* e *A. baumannii* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Apesar dos membros do gênero serem amplamente distribuídos no ambiente, esta característica é questionável para *A. baumannii*, que tem sido relatado como um micro-organismo geograficamente dependente. Ele vem sendo recuperado de uma enorme diversidade de locais (animais, plantas, solos, humanos), porém é mais relevante epidemiologicamente em países tropicais ou sub-tropicais, especialmente em países em desenvolvimento, e em meses mais úmidos e quentes (DEXTER et al., 2015).

No que diz respeito às infecções adquiridas na comunidade, as causadas por *A. nosocomialis* são raras, embora sejam igualmente graves quando comparadas àquelas causadas por *A. baumannii*. *A. pittii* tem uma alta taxa em indivíduos saudáveis. Uma pequena taxa de infecções causadas por outras espécies tem sido reportada, estas incluem infecções oculares por *A. junii* após trauma e meningite causada por *A. Iwoffii* (DEXTER et al., 2015).

As amostras de *A. baumannii* podem ser identificadas por testes genotípicos, como a busca por genes cromossômicos intrínsecos, como o *bla_{OXA51}*, que codifica as oxacilinases (OXA). Entretanto, segundo Lee et al. (2012), eventualmente outras espécies do gênero podem conter esse gene localizado em plasmídeo, como *A. nosocomialis*, evento que provavelmente pode ter ocorrido via transposição de um clone de *A. baumannii*.

2.2.2 Importância clínica e epidemiológica

Apesar de outras espécies do gênero já terem sido reportadas em doenças humanas, como *A. Iwoffii*, *A. johnsonii* e *A. radioresistens*, os membros do Complexo

ABC, exceto *A. calcoaceticus*, são clinicamente os mais significativos. No que se refere ao Complexo, destaca-se *A. baumannii*, que vem sendo frequentemente recuperado de espécimes clínicos, estando envolvido na colonização e infecção de diversos pacientes admitidos em instituições de assistência à saúde. Além disso, membros dessa espécie parecem ser resistentes a um número maior de classes de antimicrobianos do que as outras do complexo ABC, sendo habitualmente associada a uma maior taxa de mortalidade (FITZPATRICK et al., 2015).

Devido à espécie *A. baumannii* apresentar um metabolismo altamente versátil, ela pode sobreviver em condições adversas, como os ambientes secos, fator que favorece a transmissão e dispersão desse micro-organismo, principalmente no ambiente hospitalar. A capacidade de colonização de superfícies animadas e inanimadas é o fator essencial para formação de biofilmes estáveis, sendo uma das estratégias de patogenicidade dessa espécie. Estudos demonstram a correlação entre a formação de biofilme e a resistência a múltiplos antimicrobianos. A descolonização ou descontaminação dessas superfícies necessita de diversas intervenções para se evitar o desenvolvimento de IRAS, visto que são fontes de inúmeras infecções (JOSHI; LITAKE, 2013; VIANA et al., 2016; EVANGELISTA et al. 2015).

Embora seu potencial patogênico já tenha sido considerado baixo, atualmente, a espécie vem sendo descrita como uma das bactérias de maior relevância associada às IRAS (ABBOTT et al., 2013). Nesse contexto, cerca de 80% de todas as infecções hospitalares causadas por *Acinetobacter* relacionam-se à *A. baumannii* (JOSHI; LITAKE, 2013).

Desde a década de 80, a importância clínica de *A. baumannii* tem aumentado radicalmente. As infecções acarretadas por esta espécie, normalmente estão relacionadas com quadros de infecções respiratórias (principalmente pneumonia associada à ventilação mecânica), infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário, de pele e infecções de feridas cirúrgicas (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016).

Estudos recentes revelam altas e crescentes taxas de resistência do *A. baumannii* em todo o mundo, particularmente na América Latina. Em particular, há uma crescente preocupação com índices de resistência aos carbapenêmicos nos EUA,

que aumentaram de 9% em 1995 para 40% em 2004. O mesmo tem ocorrido em outros países, com o aumento de 14% em 2003 para 46% em 2008 em Taiwan. Ademais, os casos de IRAS associados à *A. baumannii* têm sido relacionados a um risco de mortalidade aumentado de 8% a 40% (LEMOS et al., 2014; MARTINS et al., 2014).

As infecções causadas por *A. baumannii* são de difícil tratamento. Contudo, esforços têm sido realizados na busca por novos agentes antimicrobianos ou por compostos alternativos aos antimicrobianos clássicos. Os peptídios antimicrobianos são exemplos de novas alternativas e que atuam contra alvos específicos, sendo bastante valorizados, ainda que alguns apresentem dificuldade para serem sintetizados e purificados, decorrente da complexidade e tamanho dos mesmos (GUZEL et al., 2014).

2.2.3 Resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos

As opções terapêuticas contra *A. baumannii* têm reduzido drasticamente nos últimos anos em decorrência dos diversos mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos expressos por este micro-organismo. Essa espécie possui habilidade ímpar de manifestar resistência a grande parte dos antimicrobianos disponíveis, de forma marcadamente superior a outros bastonetes Gram-negativos - BGN do grupo ESKAPE (GUZEL et al., 2014).

As classes de antimicrobianos que ainda apresentam alguma atividade contra o *A. baumannii*, com variações, incluem algumas fluoroquinolonas (ex. ciprofloxacina), aminoglicosídeos (ex.gentamicina, tobramicina e amicacina), carbapenêmicos (imipenem, doripenem e meropenem), polimixinas (polimixina B e colistina), tetraciclina (tigeciclina e minociclina), sulfametoxazol-trimetropim e sulbactam (disponível em combinação com ampicilina). Infelizmente, a resistência adquirida tem sido relatada para todos estes antimicrobianos, através de mecanismos enzimáticos de resistência mediados por plasmídeos (carbapenemases do tipo OXA, metalo-betalactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e metilases ribossomais de rRNA 16S); alteração do alvo de ação de antimicrobianos (topoisomerasas, proteínas ribossomais e lipopolissacarídeos, o que confere resistência a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e colistina, respectivamente) e,

perda de proteínas externas de membrana e regulação de bombas de efluxo que podem conferir resistência a betalactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tigeciclina (ABBOTT e PELEG, 2014).

Antimicrobianos da classe das colistinas ainda são considerados boas alternativas terapêuticas em infecções envolvendo bactérias multirresistentes, apesar de sua considerável toxicidade. Entretanto, o aumento do seu uso tem elevado o número de linhagens resistentes às polimixinas. Estudos recentes têm mostrado uma emergência de linhagens resistentes a polimixina B, considerada a opção terapêutica mais eficaz contra amostras de *A. baumannii* multidroga resistentes (MDR). No estudo de Martins et al. (2014), a taxa de amostras de *A. baumannii*, recuperadas da corrente sanguínea em hospitais de Belo Horizonte, resistentes à polimixina B, foi de 39,06%. Em outro estudo realizado por Genteluci et al. (2016) em um hospital universitário no Rio de Janeiro, a maioria das amostras foram resistentes a este antimicrobiano, 81,5% (n=75), apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 4-64µg/mL. Esses resultados são preocupantes, e fica cada vez mais evidente a importância do uso racional de antimicrobianos.

2.2.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *A. baumannii*

Visto a habilidade deste micro-organismo em responder aos desafios impostos pelos agentes antimicrobianos e a dificuldade de sua eliminação em ambientes nosocomiais, *A. baumannii* se torna um patógeno de grande relevância. Dentre os seus principais mecanismos de resistência destacam-se a produção de beta-lactamases, alterações na permeabilidade da membrana, e menos comumente, a superexpressão de bombas de efluxo. Geralmente os genes associados a estes fenótipos podem surgir por mutação ou recombinação, localizando-se neste caso, em elementos genéticos móveis, como plasmídios, transposons e integrons (OIKONOMOU et al., 2015).

2.2.4.1 Produção de beta-lactamases

Segundo Ambler et al. (1980), as beta-lactamases são classificadas em quatro classes (A a D), com base em suas sequências de aminoácidos. As Classes A, C e

D requerem serina em seu sítio ativo, enquanto as enzimas de Classe B requerem zinco, sendo então denominadas metalo-betalactamases.

As beta-lactamases são um grupo de enzimas bastante heterogêneo, do qual fazem parte a classe A (penicilinases), a classe B (metalo-betalactamases) e classe D (oxacilinases). Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar os antimicrobianos carbapenêmicos, além de decompor outras penicilinas e cefalosporinas (JEAN et al. 2015).

As beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) pertencem à Classe A de Ambler, e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, exceto cefamicinas. Existem mecanismos específicos para a aquisição de uma variedade de ESBL em *A. baumannii*, entretanto, a prevalência destas enzimas não é bem conhecida devido às dificuldades na detecção laboratorial. Tal dificuldade é devida à presença de uma beta-lactamase de Classe C, a AmpC, que é codificada cromossomicamente (JACOBS, 2011). Outras ESBL também têm sido descritas para essa espécie, como a TEM, VEB, SHV, BES e CTX-M, sendo esta última a família predominante na América do Sul, bem como na Espanha e no Leste Europeu (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Na classe A de Ambler também estão presentes as carbapenemases NMC-A (*not metalloenzyme carbapenemase*), IMI-1 (*imipenemase*) e SME (*Serratia marcescens enzyme*), codificados cromossomicamente; KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) e GES (*Guiana extended-spectrum*), genes presentes em integrons e/ou plasmídeos. Estas classes de enzimas são capazes de hidrolisar um amplo espectro de substratos, incluindo penicilinas, algumas cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos. Dentre essas enzimas, as pertencentes às famílias KPC e GES já foram descritas em *A. baumannii* (DJAHMI et al., 2014).

Em um estudo de Ribeiro et al. (2016), realizado em 16 hospitais no Maranhão, Brasil, observou-se que o micro-organismo mais frequentemente isolado dos pacientes avaliados (43%) foi *A. baumannii*, seguido de *K. pneumoniae* (25.2%). Interessantemente, todas as amostras foram multirresistentes a drogas, e ensaios de susceptibilidade mostraram que polimixina B foi ativa em somente 3% das amostras isoladas. Ademais, 33% das bactérias avaliadas foram positivas para o gene *bla_{KPC}*, sendo que KPC-2 e KPC-3 foram as encontradas em *A. baumannii*.

As metalo-betalactamases - pertencentes à classe B de Ambler - são caracterizadas pela sua habilidade de hidrolisar todos os beta-lactâmicos (incluindo carbapenêmicos) e aos inibidores de beta-lactamases disponíveis. Atualmente elas são divididas em três grupos, com mais de 30 famílias diferentes de MBLs, e são codificadas cromossomicamente em sua grande maioria (PALZKILL, 2013). Entretanto, as famílias mais relevantes clinicamente incluem a *Seoul imipenemase* (SIM), imipenemase (IMP), Verona imipenemase (VIM) e a *New Delhi Metalo-betalactamase* (NDM), que podem estar presentes em uma variedade de integrons e serem transferidas geneticamente. Com exceção da SIM, todas essas famílias já foram descritas em *A. baumannii*, inclusive no Brasil (PILLONETTO et al., 2014; MARTINS et al., 2014; SILVA e DOMINGUES, 2016).

No que diz respeito aos diferentes mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos, a produção de diferentes beta-lactamases do tipo serina oxacilinasas (OXA) é a mais prevalente (SOHRABI et al., 2012). As *Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases* (CHDLs), além de hidrolizarem as penicilinas, hidrolisam também o imipenem e o meropenem, embora fracamente, e não hidrolisam significativamente as cefalosporinas de amplo espectro e o aztreonam. Atualmente, existem diversos grupos de CHDLs descritos, baseados na sequência de aminoácidos que as codifica. O gênero *Acinetobacter* é o único até o momento no qual já foram descritas todas essas famílias (EVANS e AMYES, 2014). No que se refere à espécie *A. baumannii*, as relatadas foram: OXA40/24-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like e OXA-23-like, sendo essa última a mais difundida globalmente, especialmente no Brasil, onde é endêmica (PAGANO et al., 2016).

Apesar das bombas de efluxo, a deficiência de porinas e a hiperprodução da cefalosporinase AmpC contribuírem para os altos níveis de resistência aos carbapenêmicos em *A.baumannii*, as OXA ainda são consideradas a causa mais importante de não susceptibilidade a essa classe. Na última década o programa SENTRY avaliou a dispersão das OXA entre as espécies de *Acinetobacter* nas nações Ásia-Pacífico. O estudo revelou que OXA-23 foi a mais comum na China e em outros países asiáticos (>90%), sendo que destes isolados, 41% abrigavam o gene *bla*_{OXA-58} concomitantemente (JEAN et al., 2015). No que se refere ao Brasil, na última década houve um aumento de 60% nas taxas de resistência aos carbapenêmicos em centros médicos, atribuída a disseminação de OXA-23 entre *A.*

baumannii. No estudo de Martins et al. (2014) observou-se que 93,7% das amostras de *A. baumannii* isoladas de infecções da corrente sanguínea em hospitais na cidade de Belo Horizonte eram carreadoras desse gene. Dessa forma, esse seria um dos mecanismos mais comum de resistência entre as amostras clínicas no Brasil (GALES et al., 2012).

2.2.4.2 Alteração da permeabilidade da membrana

Porinas são proteínas que desempenham diversas funções na célula. Elas formam canais na membrana, permitindo o transporte de moléculas através da bicamada lipídica e apresenta baixa permeabilidade a solutos hidrofílicos. Além disso, elas também podem agir como alvos potenciais para a adesão em outras células e ligação de compostos bactericidas à superfície de bactérias Gram-negativas (GORDON e WAREHAM, 2010). Uma pequena variação na sua estrutura pode provocar resistência a antimicrobianos, pois uma mudança na conformidade da proteína resulta na diminuição da absorvidade da membrana, dificultando assim a entrada do fármaco na célula (RUMBO et al., 2013).

As bactérias Gram-negativas apresentam diversas porinas em sua membrana externa, as quais participam da modulação da permeabilidade celular. A proteína de membrana externa A (OmpA) é uma das mais abundantes. Ela é uma porina altamente conservada entre as espécies de *A. baumannii* e tem sido associada com diversas propriedades biológicas, como se ligar às células epiteliais e induzir a morte celular, além de se ligar ao fator H, o que permite às amostras de *A. baumannii* desenvolver resistência ao soro. A proteína OmpA tem sido relacionada também à resistência a antimicrobianos em patógenos relacionados (SMANI et al., 2014).

Sabe-se que em *A. baumannii* os canais de membrana são menores e estão em menor quantidade do que em outras bactérias Gram-negativas, o que pode explicar a alta resistência aos antimicrobianos apresentada por este patógeno, especialmente aos carbapenêmicos. Sendo assim, variações na estrutura dessas porinas são um dos mecanismos de escape da pressão seletiva dos antibacterianos. Do mesmo modo, a regulação da expressão de porinas em resposta à presença de antimicrobianos é uma estratégia de sobrevivência que tem sido desenvolvida por diversas bactérias (SINGH et al., 2013).

2.2.4.3 Sistemas de efluxo

Os sistemas de efluxo desempenham múltiplos papéis na célula. São importantes para a desintoxicação de metabólitos intracelulares, para a sinalização intercelular, para a manutenção da homeostase da célula e também tem um papel relevante na patogenicidade bacteriana (MARTINEZ et al., 2009).

A remoção dos antimicrobianos via bombas de efluxo contribui significativamente para a resistência a estes fármacos. Os principais sistemas de efluxo bacterianos estão reunidos em seis famílias: a família de extrusão de compostos tóxicos e de multidrogas (MATE), a superfamília *ATP binding cassette* (ABC), a principal superfamília facilitadora (MFS), a família resistência-nodulação-divisão (RND), a família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e a mais recentemente descrita, nomeada efluxo de compostos antimicrobianos de proteobactérias (PACE) (LI et al., 2016).

Dentre estas seis famílias, a RND desempenha o papel mais importante na resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos, seguida das famílias MFS e SMR. As bombas do tipo RND são compostas por três bombas, apresentando ampla especificidade por substrato, que podem incluir biocidas, detergentes e anti-sépticos. Três sistemas do tipo RND já foram caracterizados em *A. baumannii*, AdeABC, AdeIJK, e AdeFGH, e têm sido relatadas como causa da MDR neste patógeno (LI et al., 2016). Um estudo de NI et al. (2016) tem atribuído as bombas de efluxo da família RND em Gram-negativas à resistência a colistina, no qual inibidores de bombas foram utilizados favoravelmente para suprimir e reverter esse quadro.

No que se refere à família MATE, uma bomba foi caracterizada em *A. baumannii*. De acordo com Coyne et al. (2011), *AbeM* resulta no efluxo de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim e brometo de etídio. Entretanto, estudos recentes apontam que este sistema tem um fraco impacto na resistência.

Em relação à família MFS, alguns de seus membros são a TetA, TetB, AmvA, CmlA, FloR e a mais prevalente CraA, que confere resistência intrínseca ao cloranfenicol. FloR confere resistência ao cloranfenicol e florfenicol, enquanto CmlA confere resistência apenas ao cloranfenicol. AmvA confere resistência aos detergentes,

desinfetantes e eritromicina, e sua superexpressão tem sido associada ao aumento da resistência em amostras clínicas de *A. baumannii*. Do mesmo modo, diversas outras bombas têm sido associadas ao efluxo de tetraciclinas, sendo a TetA a mais prevalente. Ela confere resistência à tetraciclinas, mas TetB está relacionada não somente a ela, mas também à doxiciclina e minociclina (RUMBO et al., 2013).

Outro sistema de efluxo recentemente descrito, designado de AbeS, é codificado cromossomicamente, e pertence à família SMR. Essa bomba tem sido caracterizada em amostras clínicas de *A. baumannii* MDR e pode contribuir para a resistência ao cloranfenicol, fluoroquinolonas, eritromicina e à novobiocina, além de resistência a detergentes. Entre quatro linhagens de *A. baumannii* sequenciadas, o gene *abeS* encontrado foi altamente conservado em três, e ausente na linhagem remanescente (COYNE et al., 2011).

2.2.5 Fatores de patogenicidade

Em indivíduos saudáveis, os patógenos oportunistas raramente são aptos para causar uma infecção, isso porque muitas vezes eles são incapazes de evadir a eficiente resposta primária do sistema imune. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, debilitados e/ou submetidos a procedimentos invasivos, os patógenos podem reverter esse processo e provocar uma doença, sendo a sua gravidade dependente, dentre outros fatores, da patogenicidade e da resistência presentes naquele micro-organismo (BECEIRO et al., 2013).

A. baumannii frequentemente exibe resistência aos antimicrobianos, esse fato tem emergido como um significativo problema clínico no mundo inteiro. Este micro-organismo tem sido implicado em diversos tipos de infecções, atuando como um problema particularmente nas UTIs, onde os numerosos surtos são difíceis de controlar. A sua rápida emergência e disseminação global como patógeno nosocomial é destacada, e demonstra seu sucesso durante a adaptação no ambiente hospitalar no século XXI (GORDON e WAREAN, 2010).

Os inúmeros fatores de patogenicidade apresentados por essa espécie estão em constante mudança, isso para se adaptarem ou evadirem do sistema imune do hospedeiro, ou até mesmo para sobreviver as mais diversas condições ambientais. Esse fato ocorre concomitantemente à evolução da resistência aos antimicrobianos,

o que torna esse micro-organismo uma preocupação para o corpo clínico. Dessa forma, o balanço final em uma doença infecciosa irá depender diretamente da sua patogenicidade em diversos aspectos (GORDON; WAREAN, 2010).

2.2.5.1 Fímbrias

Os *pili* de *A. baumannii* desempenham importante papel na adesão a superfícies inertes ou vivas, e na formação do biofilme bacteriano (HOMENTA et al., 2014). Além disso, eles podem não apenas promover aderência, mas também o acoplamento deles aos receptores das células hospedeiras é capaz de induzir a inflamação através da produção de mediadores, incluindo quimiocinas e citocinas. De acordo com um estudo realizado por De Breij et al. (2009) em *A. baumannii* ATCC 19606, a microscopia eletrônica apontou a existência de dois tipos de *pili* nesta espécie: o *pilus* curto (5-140nm) e o *pilus* longo (143-1008nm).

Uma das estruturas proteicas mais comuns que ornamentam a superfície externa de patógenos são os *pili* Tipo I, os quais desempenham uma função essencial na aderência nos patógenos Gram-negativos. Quatro *clusters* gênicos que codificam estes *pili* já foram identificados em *A. baumannii*, sendo o cluster *csu* o mais estudado e caracterizado funcionalmente. Os *clusters* dos genes ortólogos aos genes fimbriais (A1S_1507_1510) são bem conservados dentre as sete linhagens virulentas de *A. baumannii* investigadas no estudo de Eijkelkamp et al. (2014). Interessantemente, este cluster parecem ser *down-regulated* na linhagem de *A. baumannii* ATCC 17978 sob condições limitantes de ferro, que tem diversos efeitos na formação da película.

Segundo Luo et al., (2015), os *pili* de *A. baumannii* são codificados principalmente pelo operon *csuA/BABCDE*, um sistema de *chaperona-usher*, que é controlado por dois sistemas regulatórios, os genes *bfmS* e *bfmR*. Estudos prévios mostraram que BfmR é essencial para a estabilização do operon *csu*; e a expressão dos genes *csuC* e *csuE* estão envolvidos na fase inicial de adesão durante o processo de formação de biofilme. Estes dados sugerem que estes *pili* são essenciais para a formação de biofilme por *A. baumannii*. Além disso, este estudo também provou que moléculas sinalizadoras de *Quorum sensing* (QS) podem aumentar a expressão de proteínas do operon *csu*.

Por outro lado, Marti et al. (2011) relataram que *A. baumannii* é capaz de formar biofilme na interfase líquido-ar mais facilmente do que outras espécies do gênero, e que para isso, diferentes tipos de *pili* são requeridos, não somente para promover a adesão bacteriana, mas também para manter toda a estrutura suspensa na superfície do meio líquido. Estas proteínas incluem duas chaperonas associadas ao sistema de formação de *pili* e um *pilus* putativo do tipo III.

Além das proteínas do operon *csu*, Marti et al. (2011) também identificaram a super-expressão de outras proteínas na película que não pertencem a este operon: o *pilus* P, codificado pelo operon Pap, o qual tem sido descrito em *E. coli* como um fator de patogenicidade; e o *pilus* FiLF, que é um tipo de *pili* III, sendo raramente descritos em amostras clínicas de *Burkholderia cepacia*. Ademais, este estudo demonstrou que há uma diferença no comprimento dos *pili* nos estágios de células planctônicas e em película, o que corrobora com a diferença de expressão protéica entre essas duas fases. Esta múltipla expressão de diferentes sistemas de formação de *pili* requeridos para a adesão bacteriana pode também contribuir para a persistência peculiar de *A. baumannii* em instituições de cuidados à saúde.

2.2.5.2 Cápsula

No que se refere aos fatores de patogenicidade de *A. baumannii* que contribuem para a sua patogenicidade, destaca-se a cápsula bacteriana. Este envelope está associado a muitos determinantes de patogenicidade em modelos de doenças em mamíferos (GEINSINGER; ISBERG, 2015). Acredita-se que a camada de exopolissacarídeos do qual é constituída proporciona um revestimento que protege as células do ambiente externo, aumentando a resistência à fagocitose, desinfecção e dessecação, bem como é essencial para a sua sobrevivência no soro humano e nos tecidos de camundongo em modelo animal (KENYON et al., 2015a).

Uma relação foi previamente descrita entre bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes com bacteremia e seus respectivos graus de resistência *in vitro* para a atividade lítica do sistema do complemento, assim como a sua habilidade de sobreviver em fluidos. O Lipopolissacarídeo O e a cápsula polissacarídica estão ambos envolvidos neste fenômeno. A cápsula é conhecida por bloquear o acesso do sistema do complemento à parede celular bacteriana e de preveni-la de vias

alternativas de ativação do complemento, como demonstrado em modelos de infecção por Gram-negativos (GOEL e KAPIL; 2001).

A cápsula polissacarídica é formada por polímeros de alto peso molecular de repetidas unidades de oligossacarídeos, os quais são compostos pela união de vários açúcares, sintetizados por vias específicas. No genoma de *A. baumannii* existem *clusters* gênicos com sequência variável (o locus K) que direciona essa síntese, montagem e exportação (KENYON et al., 2015b). Um estudo realizado por Geinsinger e Isberg (2015) corrobora com esses dados. Estes autores demonstraram que os polissacarídeos do locus K facilitam a resistência a múltiplos antimicrobianos, e que a bactéria responde a certos antimicrobianos em concentrações subinibitórias, aumentando assim a produção da cápsula. Esse acréscimo na produção é mediado via superexpressão do locus gênico K, ampliando a habilidade da bactéria em superar o ataque do sistema do complemento. Dessa forma, infere-se que a expressão gênica em *A. baumannii* é afetada em cenários onde se observa tratamentos com antimicrobianos inadequados, sendo esta uma possível causa para a transição entre estágios de baixa e alta patogenicidade, o que pode contribuir diretamente na natureza oportunista desse patógeno.

Em *Acinetobacter* spp. o locus K inclui genes como o *wza*, *wzb* e *wzc*, que codificam proteínas relacionadas à montagem e exportação da cápsula, e sua expressão seria a conclusão de que a cápsula está sendo sintetizada. Estes genes têm sido identificados em espécies do gênero como *A. Iwoffii* (KENYON et al., 2013). Em *A. baumannii*, a composição do locus K pode exibir diversidade entre as linhagens, porém ele é cercado por unidades flanqueadoras altamente conservadas. Na região 5' do *cluster* há o gene *wzc* (também referido como *ptk*), que codifica uma tirosina kinase necessária para a exportação da cápsula. A inserção do transposon no gene *wzc* de *A. baumannii* 307-0294 revoga completamente a produção da cápsula (GEISINGER e ISBERG, 2015; RUSSO et al., 2010).

Um segundo módulo altamente conservado, localiza-se na extremidade 3' do *cluster* e faz a síntese de açúcares simples ligado a uridina difosfato - UDP. A região interveniente contém vários genes específicos para cada tipo de cápsula, mas invariavelmente contém uma glicosiltransferase inicial, a *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*, codificada pelo gene *gaiU*, necessária para a construção das

unidades de repetição dos glicanos que compõem a cápsula exopolissacarídica (GEISINGER e ISBERG, 2015).

Ainda de acordo com Geinsinger e Isberg (2015), experimentos com mutantes deficientes em certas funções desse cluster têm demonstrado interferência na cápsula, no crescimento da bactéria dentro de sítios de infecções de tecidos moles, na letalidade em camundongos modelos com septicemia e na modulação do biofilme. Sendo assim, devido a essa importância em infecções em modelos animais e em sua imunogenicidade, a cápsula tem sido proposta como um alvo para intervenções baseadas em anticorpos protetores.

2.2.5.3 Formação de biofilme

Segundo Subhadra et al. (2016) biofilme é uma comunidade complexa de múltiplas células bacterianas associadas a uma superfície (biótica ou abiótica), com um arranjo tridimensional em íntimo contato entre si, e cobertas por uma matriz extracelular, que pode ser composta por carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e outras macromoléculas. O início e o desenvolvimento do biofilme não são caracterizados por uma simples e aleatória aderência de células bacterianas a uma superfície. É um processo altamente controlado, com uma série de eventos moleculares mantidos sobre fina regulação (GADDY; ACTIS, 2009a).

A estrutura do biofilme pode oferecer sobrevivência e resistência da bactéria aos antimicrobianos muito maiores do que em micro-organismos planctônicos. Além disso, estudos recentes têm revelado que a transferência de genes entre elas também é mais frequente nesse estado de matriz (SUBHADRA et al., 2016). Sabe-se que a habilidade de *A. baumannii* formar biofilme em superfícies abióticas exerce um papel importante em doenças infecciosas nosocomiais, devido à colonização de equipamentos hospitalares e artigos médicos, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais e tubos endotraqueais (LONGO et al., 2014).

Os fatores mais comuns que podem interferir na formação do biofilme são: disponibilidade de nutrientes, apêndices bacterianos (*pili* e flagelos), componentes da superfície bacteriana (proteínas da membrana externa, adesinas), *quorum sensing* e secreção de macromoléculas (polissacarídeos, ácidos nucleicos, entre

outros). Em adição, o complexo inclui dois sistemas regulatórios e reguladores transcricionais, o *bfmRS*, que são conhecidos por serem responsáveis pela expressão de uma variedade de genes associados à formação de biofilme, em resposta a uma variedade de sinais ambientais (GADDY e ACTIS, 2009a).

Atualmente, diversos mecanismos moleculares relacionados à formação de biofilme têm sido estudados. Dentre os genes associados a essa propriedade estão o locus *csu* (que codifica uma chaperona-usher fimbrial), o locus *pga* (que codifica o polissacarídeo poli-N-acetilglicosamina), *ompA* (que codifica proteínas de membrana externa [OmpA]) e o *bap* (que codifica as proteínas associadas a formação de biofilme [Bap]) (GOH et al., 2013).

No estudo de Gaddy et al. (2009b) a proteína de membrana externa OmpA, uma porina trimérica de 38kDa que atua como um poro de difusão, desempenha o papel de adesão de *A. baumannii* em plásticos e também na interação do micro-organismo com células epiteliais humanas, contribuindo para a disseminação da infecção causada por esse micro-organismo. No ambiente, OmpA facilita a sua persistência pela formação de biofilme, além de influenciar na sua motilidade superficial (CLEMMER et al., 2011).

Durante a análise molecular das proteínas associadas à formação de biofilme, Goh et al. (2013) analisaram a prevalência, expressão e função de Bap na formação de biofilme de 24 amostras clínicas resistentes aos carbapenêmicos isoladas de uma instituição. Eles demonstraram que esta proteína era expressa por quase todas as amostras, sendo as Bap-positivas fortemente associadas à formação de biofilme. Além disso, eles demonstraram que esse fenômeno poderia ser inibido por anticorpos anti-Bap purificados, o que revela uma contribuição direta de Bap para a produção de biofilme em amostras clínicas de *A. baumannii*.

2.2.5.4 Vesículas de membrana externa

Todas as bactérias Gram-negativas patogênicas e não patogênicas produzem vesículas de membrana externa (OMVs) em uma variedade de ambientes. Essas são o modo pelo qual as bactérias interagem com o meio, sendo relacionadas a diversas funções, como promover a patogênese, a resistência em condições de

estresse e regular a interação dentro de comunidades bacterianas. No que se refere à biotecnologia, devido a sua versatilidade, pesquisadores começaram a explorá-las com potenciais aplicações na área de bioengenharia (SCHWECHHEIMER e KUEHN, 2015).

As OMVs são nanomoléculas esféricas que se desprendem da membrana externa, e podem conter adesinas, toxinas e compostos imunorreguladores, mediando diretamente a ligação e invasão bacteriana, causando assim uma citotoxicidade e modulação da resposta imune do hospedeiro. A exploração dos componentes químicos das OMVs mostrou que elas contêm, primariamente, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa. Entretanto, algumas vezes elas podem conter proteínas citoplasmáticas e da membrana interna, DNA, RNA e íons metabólicos (ROIER et al., 2015).

Apesar da maioria dos mecanismos de biogênese das OMVs descritos até hoje ser espécie-específicos, recentemente foi proposto um mecanismo geral entre as bactérias Gram-negativas. Em um estudo de Roier et al. (2015), foi demonstrado que um cassete, o *ATP-binding cassette* (VacJ/Yrb ABC), suposto transportador de lipídeos, está envolvido nesse processo. A expressão diminuída desse cassete resulta no acúmulo de fosfolipídeos indutores de curvatura na membrana externa, resultando no abaulamento e compressão da membrana para gerar as OMVs. Além disso, essa produção está ligada a disponibilidade de ferro, proporcionando um meio de regulação em todas as fases de crescimento, com um papel importante na fisiopatologia *in vivo*.

OMVs são conhecidas por transportar metabólitos, sinais de *quorum sensing* e outras pequenas moléculas, além de facilitar a secreção de materiais hidrofóbicos. Dentre as suas funções estão a participação na formação de biofilme, competição com outras células microbianas, distribuição de biomoléculas entre as células, nutrição, aderência aos tecidos do hospedeiro, defesa e resistência aos antimicrobianos. Por participarem de diversos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, as OMVs são consideradas potentes fatores de patogenicidade (KULKARNI e JAGANNADHAM, 2014).

Em contrapartida, devido à presença de múltiplas proteínas antigênicas, pesquisadores têm focado em vacinas baseadas em OMVs, demonstrando que elas

são candidatas promissoras contra infecções bacterianas. Recentemente, Hozbor (2015) provou que uma vacina contra coqueluche baseada em OMVs contém um número muito maior de imunógenos do que a vacina utilizada convencionalmente, além de ser menos tóxica e mais atrativa economicamente. McConnell et al. (2011) utilizou OMVs de *A. baumannii* em um modelo animal de sepse disseminada. A imunização produziu uma resposta robusta de anticorpos contra múltiplos antígenos bacterianos específicos. Os camundongos imunizados apresentaram menor carga bacteriana tecidual e menores níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-1, pós-infecção, em comparação com os camundongos controles. Estes resultados indicam que a vacinação com OMVs pode ser uma estratégia viável para a prevenção da infecção por *A. baumannii*.

Entre as variedades de proteínas de membrana de bactérias Gram-negativas, a proteína A do *A. baumannii* (AbOmpA), uma porina que permite a passagem de solutos pela membrana externa, foi identificada como um fator de patogenicidade que induz à morte celular via alvos mitocondrial e nuclear. Rumbo et al. (2014), demonstraram que outra porina, a Omp33-36 também é liberada através das OMVs e, assim como OmpA, representam um considerável fator de patogenicidade bacteriano por induzir à morte celular. Sendo assim, as OMVs desempenham um importante papel, empacotando essas proteínas e fazendo a transferência destas para a célula hospedeira, levando à citotoxicidade. A transferência do conteúdo das OMVs para a célula hospedeira é realizada através da via endocítica mediada por receptor ou pela fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira. Entretanto, estudos ainda são necessários para a completa elucidação do processo (JIN et al., 2011).

Estudos prévios sugeriram que as vesículas de membrana também podem estar envolvidas na transferência de material genético entre bactérias de espécies similares (CIOFU et al., 2000). Rumbo et al. (2011) demonstraram pela primeira vez que as OMVs podem agir como vetores de plasmídeos, transferindo genes de resistência aos carbapenêmicos entre linhagens de *A. baumannii*, como o *bla*_{OXA-24}, sem a perda de viabilidade. Dessa forma, este fenômeno representa um novo mecanismo de disseminação de genes de resistência com impacto clínico, além daqueles já descritos, como a conjugação, transformação e a transdução.

No estudo de Liao et al. (2015) foi demonstrado que houve a liberação extracelular de carbapenemases de classe D feita através de OMVs, em linhagens onde elas foram superexpressas através de um promotor forte. A liberação de OXA-58 extracelular aconteceu dependentemente da translocação via Sec, um sistema de secreção bacteriano, e que ocorreu também na ausência de carbapenêmicos. A adição desse antimicrobiano aumentou a liberação de OMVs e causou a lise celular, contribuindo para o *sheltering effect* (efeito protetor de bactérias susceptíveis), as quais coexistem com linhagens resistentes aos carbapenêmicos. Dessa forma, esse efeito se torna clinicamente relevante, uma vez que 20% a 50% das infecções por *A. baumannii* são polimicrobianas.

2.2.5.5 Sistema de *quorum sensing*

O *quorum sensing* é um sistema de comunicação intraespécies microbianas em resposta às mudanças na densidade celular e à composição do ambiente que as circunda, o qual possibilita mudança coletiva de comportamento. Este mecanismo envolve a produção, liberação e detecção de sinais químicos extracelulares chamados de autoindutores, que agem se ligando a proteínas reguladoras de transcrição. Essas moléculas se acumulam no ambiente à medida que a densidade populacional aumenta. Quando um limiar é atingido, as bactérias ativam a expressão ou repressão de certos genes no organismo microbiano (PAPENFORT e BASSLER, 2016).

A comunicação celular em bactérias Gram-negativas é mediada principalmente pela produção de sinalizadores do tipo N-acil-homoserina lactonas (AHLs), porém outras moléculas também podem atuar nesse processo, como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona e as dicetopiperazinas. O QS mediado pelas AHLs regula vários processos metabólicos, incluindo a expressão de genes de patogenicidade, motilidade, transferência plasmidial, formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos. O QS facilita a população microbiana a sobreviver e proliferar melhor em um ambiente, com uma efetiva comunicação intercelular (SUBHADRA et al., 2016).

De acordo com Prashanth et al. (2012), 63% das amostras de *Acinetobacter* presentes nesse estudo produziram mais do que uma AHL, sendo identificadas no

mínimo seis moléculas na grande maioria das amostras de *A. baumannii* avaliadas. No entanto, nenhum dos sinais de AHL pôde ser especificamente designado para uma espécie particular do gênero. As condições nutritivas afetaram a comunicação celular e a expressão de *quorum sensing* dos genes controlados. Em amostras de *A. baumannii* isoladas de espécimes clínicos, diferentes moléculas sinalizadoras de QS, capazes de ativar AHLs, foram responsáveis pela etapa inicial da cascata de sinalização e mostraram atividade máxima na fase estacionária de crescimento.

Segundo Stacy et al. (2012) o sistema QS é mediado muitas vezes por duas proteínas, pertencentes à família de proteínas LuxI e LuxR. O gene *luxI* sintetiza AHs que interagem diretamente com as proteínas cognatas do tipo LuxR, que são receptores autoindutores transcricionais. Esse complexo ativa uma sequência promotora específica chamada lux-box, que regula a expressão de genes alvos do QS.

A habilidade de *A. baumannii* persistir no ambiente tem sido atribuída à sua capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Recentemente essa formação de biofilme foi relacionada à LuxI/LuxR. Ademais, a motilidade superficial, que tem um papel importante na formação de biofilme, também foi controlada por estes sinais de *quorum sensing* (Stacy et al., 2012). No estudo de Gaddy e Actis (2009), a mutação em *abal*, um gene que produz moléculas de acil-homoserina lactona, resultou na redução de 30-40% do biofilme, quando comparado com a sua linhagem isogênica parental. Por outro lado, a adição exógena de acil-homoserina lactona purificada de *Acinetobacter* restaurou a maturação do biofilme em *abal* mutante.

Atualmente existem diversos estudos relacionados à pan-resistência em *A. baumannii*. QS exerce uma importante atribuição na multiresistência em diversas maneiras, como a super-regulação da formação de biofilme associado à matrix exopolissacarídica (EPS) e a regulação de genes de bombas de efluxo. O EPS age como uma barreira contra os antimicrobianos, evitando o acesso deles às comunidades microbianas. No que diz respeito às bombas de efluxo, essa relação já está bem descrita em *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*. Em *A. baumannii*, há a produção de C12-HSL, um tipo de molécula QS, que é responsável pela regulação da bomba de efluxo MexAB em *P. aeruginosa*. O gene *mexAB* possui uma

similaridade de 47% com uma bomba de efluxo presente em *A. baumannii*, a RND. Esse fato mostra que pode haver uma relação entre estes fatores também neste micro-organismo (SUBHADRA et al., 2016).

Por fim, Bhargava et al. (2014) mostraram que a catalase e a superóxido dismutase (SOD), que participam do processo de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), são positivamente controladas por QS em *A. baumannii*. Estes autores estudaram os mecanismos envolvidos na formação de biofilme durante a coexistência entre *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Esse micro-organismo induz a geração de ROS em *A. baumannii*, que em resposta aumenta significativamente a produção de catalase e SOD. Além disso, uma linhagem de *A. nosocomialis* mutada para um gene autoindutor sintase apresentou menores níveis de catalase e SOD do que a linhagem não mutada.

Os sinais de *quorum sensing* em *Acinetobacter* não são homogeneamente distribuídos, assim, a distinção entre as linhagens virulentas e não virulentas baseados nestes sinais é difícil. Entretanto, sabe-se que a comunicação entre as bactérias com relação à densidade celular é essencial para vários fatores de patogenicidade em *A. baumannii*. Esse mecanismo regulatório impacta a expressão de uma gama de vias que aumentam a persistência desse micro-organismo em condições ambientais hostis, como a dissecação, restrição de nutrientes e em tratamentos com antimicrobianos (SUBHADRA et al., 2016).

2.2.5.6 Indução de morte celular em células do hospedeiro

Infecções provocam diversas respostas no hospedeiro, que podem incluir ativação do sistema imune, inflamação e morte celular. A morte celular é o resultado mais comum, podendo se manifestar de diferentes formas, como apoptose, necrose ou piroptose. O modo como acontecerá essa morte celular depende de diversos fatores, que compreendem a natureza do patógeno, a carga microbiana e o sítio da infecção. Alguns patógenos possuem mecanismos de patogenicidade capazes de inibir a morte celular para o seu sucesso durante a infecção. Contrariamente, outros conseguem induzir a morte de células do sistema imune, objetivando a subversão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (HOSSAIN e FAKRUDDIN, 2012).

Apoptose é um tipo de morte celular programada, não-inflamatória, ATP-dependente, e é morfológicamente caracterizada por uma vesiculação da membrana plasmática, encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Ademais, ela vem acompanhada por uma sequência de mudanças nas características bioquímicas, que englobam a permeabilização da membrana externa mitocondrial, ativação de caspases (com exceção da caspase 1) e a ativação de hidrolases catabólicas, as quais degradam a maioria das macromoléculas da célula, incluindo o DNA. Por outro lado, a necrose é caracterizada pela ruptura da membrana, inchaço nuclear e liberação do conteúdo intracelular, e é acompanhada por inflamação. Ela é um processo acidental, ATP-independente, e é desencadeada pela produção de ROS ou sinais de perigo, tais como desestabilização lisossomal, liberação de calpaínas e depleção de ATP, que são induzidos por infecção bacteriana ou danos físicos. No que se refere à piroptose, ela é um tipo de morte celular programada que é coordenada pelo inflamassoma e acompanhada pela ruptura da membrana, fragmentação do DNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e IL-18. Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) são reconhecidos por proteínas NLR, que iniciam o processo de montagem do inflamassoma para ativar caspase-1, e desencadear então a piroptose (FIGURA 1) (ASHIDA et al., 2011).

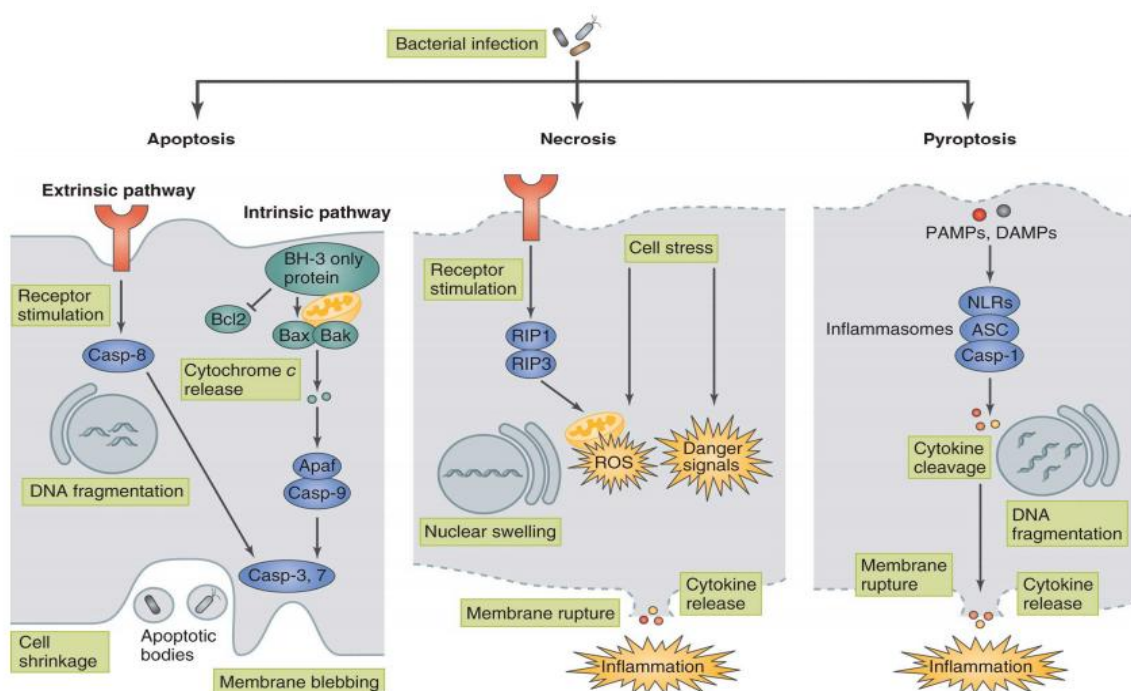


Figura 1 - Tipos de morte celular induzidas por infecções bacterianas (ASHIDA et al., 2011)

A apoptose é um mecanismo importante de defesa celular durante uma infecção por patógenos, e a mitocôndria tem uma importante atribuição em modular essa morte celular. Ela é desencadeada por duas vias diferentes, a via intrínseca (mediada pela mitocôndria) e a via extrínseca (mediada via receptor). A via extrínseca é ativada sob estimulação dos chamados receptores de morte celular, que incluem CD95 (também conhecido como FAS), receptor de fator de necrose tumoral 1 ou o receptor de TNF relacionado ao ligante indutor de apoptose (TRAILR). Estes receptores transmitem sinais externos para a maquinaria de morte celular, que resulta na ativação das caspases 3 e 7, e no fim, na ativação da via intrínseca. No que se concerne à via intrínseca, ela é iniciada através de um evento central: permeabilização da membrana externa mitocondrial. Vários estímulos intrínsecos ativam proteínas da família *BH3-only*, as quais promovem a oligomerização de proteínas pró-apoptóticas na membrana externa da mitocôndria, o que resulta na liberação de citocromo c para o citoplasma. Este por sua vez, estimula a formação do apoptosoma, um complexo protéico multimérico que ativa a caspase-9, que cliva e ativa outras caspases que quebram numerosos substratos e por fim, induzem a apoptose. O bloqueio ou o atraso da morte celular é uma estratégia interessante usada pelos patógenos para promover a sobrevivência e replicação intracelular (ASHIDA et al., 2011).

Estas características morfológicas e bioquímicas facilitam a detecção da apoptose, apesar do fato de células que morrem *in vivo* são geralmente englobadas e degradadas por células saudáveis antes de adquirirem um fenótipo apoptótico completo, o que significa que a incidência de apoptose é frequentemente subestimada (GALLUZZI et al., 2009).

Durante o processo apoptótico acontece um importante fato: a externalização da fosfatidilserina. A fosfatidilserina, componente dos fosfolípidos da face interna da membrana plasmática, redistribui-se e se externaliza para fora da membrana nas fases iniciais da apoptose. Esse evento age como uma sinalização celular para permitir a fagocitose daquela célula apoptótica por outros fagócitos. Para a detecção de fosfatidilserina na superfície das células, a anexina A5 pode ser utilizada como

um ligante marcador, uma vez que ela se liga fortemente e especificamente a fosfatidilserina durante o processo de morte celular. A anexina A5 é uma proteína endógena humana que pertence a uma família de ligantes de cálcio e fosfolípides, e participa de uma gama de funções na célula, como sinalização, migração celular, proliferação e apoptose. Ela é a proteína mais amplamente utilizada para visualizar a morte celular (ZHANG et al., 2013; MARINO e KROEMER, 2013; BRAZIER et al., 2016).

O iodeto de propídeo (IP) é extensamente utilizado em conjunto com anexina A5 para determinar se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas, através de diferenças apresentadas na integridade e permeabilidade da membrana celular. Ele é um corante economicamente viável e tem a capacidade de distinguir entre células mortas e vivas. A habilidade de IP entrar na célula depende da permeabilidade da membrana; IP não penetra em células vivas ou nas fases iniciais da apoptose devido à presença da membrana plasmática intacta. No entanto, nos estágios tardios da apoptose e em células necróticas, a integridade das membranas plasmática e nuclear diminui, permitindo o IP alcançar os ácidos nucléicos e intercalar-se a eles, emitindo fluorescência (RIEGER et al., 2011). Dessa forma, as células apoptóticas podem ser distinguidas de células necróticas por citometria de fluxo, pela concomitante coloração de anexina A5 e IP, apresentando as células necróticas fenótipo positivo para os dois corantes, e as células apoptóticas em estágio inicial, positivas somente para a anexina A5 (FIGURA 2) (CROWLEY et al., 2016).

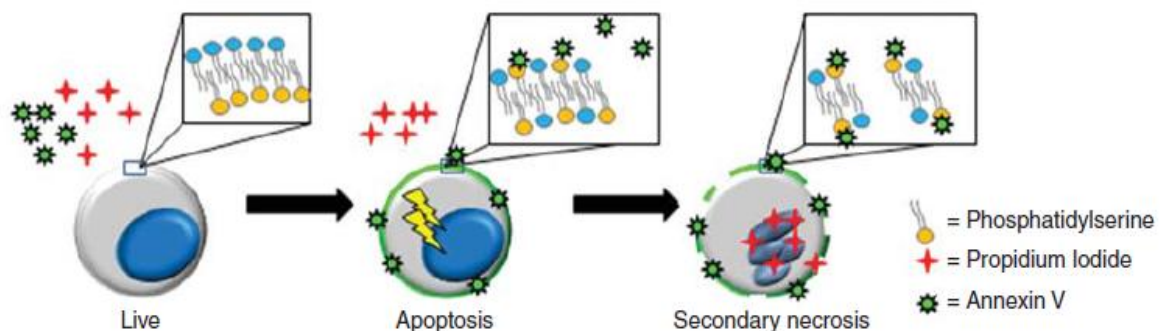


Figura 2 - Morte celular avaliada por coloração com IP e anexina A5 (CROWLEY et al., 2016)

Diversos patógenos têm sido relatados como indutores de apoptose, devido a diferentes mecanismos, incluindo a produção de toxinas bacterianas ou a expressão de fatores de patogenicidade que interagem diretamente com os compostos-chave da maquinaria celular (RUMBO et al., 2014). No estudo de Smani et al. (2011a) investigou-se a natureza da morte celular induzida por *A. baumannii* através da coloração de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). O exame morfológico do núcleo celular corado com DAPI mostrou que células A549 expostas à linhagem de referência de *A. baumannii* ATCC 19606 apresentaram típica morfologia apoptótica, com condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. Ademais, foi demonstrado nesse estudo que as linhagens sensíveis a antimicrobianos induzem mais morte celular quando comparadas àquelas multi-resistentes.

Por fim, Smani et al. (2011b) atestaram que a amostra de *A. baumannii* ATCC 19606 provoca uma perturbação na homeostase do cálcio em células eucarióticas, com subsequente ativação de caspase-3 e calpaínas, induzindo assim a morte celular de células epiteliais de pulmão. Eles demonstraram que o estresse oxidativo, as citocinas IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) também estão envolvidas no processo de morte celular, sendo o TNF- α um importante mediador extrínseco da apoptose, o qual se liga a receptores específicos e inicia a ativação de caspases-3, 8 e 10. Além disso, IL-6 tem mostrado induzir apoptose mediante a expressão modulada de fatores pró- e anti-apoptóticos envolvidos na ativação da via intrínseca da apoptose.

A proteína OmpA, também conhecida como Omp38, e o lipopolissacáride (LPS) da membrana externa de *Acinetobacter* spp. podem desempenhar importantes funções em sua patogenicidade, resultando em letalidade em animais experimentais e citotoxicidade de células fagocíticas e epiteliais. LPS está envolvido com uma forte reação inflamatória e a produção de citocinas e de TNF- α (KRZYMINSKA et al., 2012). A proteína AbOmpA é responsável pela aderência e invasão em células epiteliais durante a colonização, constituindo um potente fator de patogenicidade. Ela pode ser secretada via OMVs, e contribui para a biogênese de tais vesículas. A exposição a essa proteína purificada leva a apoptose de células eucarióticas através do alvo mitocondrial e nuclear, além de liberar moléculas pró-apoptóticas como citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF) sendo então responsável pela morte celular (CHOI et al., 2005; JIN et al., 2011; MOON et al., 2012).

Segundo Rumbo et al. (2014), a proteína Omp33, que é codificada pelo gene *omp33* (também conhecido como *omp-33-36*, *omp34* ou *mapA*), é uma porina que age como um canal para a passagem de água através da superfície celular, mas também tem atribuições na patogênese de *A. baumannii*. Ela é liberada no interior de OMVs e foi responsável por causar a fragmentação do DNA em células Hep-2, assim como a ativação das caspases-3 e 9. Dessa forma, confirma-se que esta porina é capaz de induzir a apoptose em células eucarióticas, além de modular a autofagia, agindo similarmente a um bloqueador do processo, com consequente acumulação de auto-fagossomos para evitar a degradação bacteriana.

2.2.5.7 Resistência ao estresse oxidativo

As bactérias possuem um sistema de detecção e remoção de oxidantes endógenos e exógenos aos quais elas são expostas. O oxigênio pode receber elétrons de redutores e gerar espécies reativas do oxigênio (ROS). Eles são produzidos pelo metabolismo aeróbio, ou durante a exposição às drogas redutoras, ou mesmo durante a fagocitose em uma infecção, o que pode ser prejudicial e causar danos aos componentes celulares. Os ânions superóxidos ($\bullet\text{O}_2^-$) são gerados quando uma molécula de oxigênio recebe um elétron de um doador, tal como uma flavoproteína. Similarmente, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido quando dois elétrons são recebidos de uma molécula de oxigênio. Superóxido e H_2O_2 podem inativar enzimas que rompem os aglomerados de ferro e enxofre. O H_2O_2 reage com ferro férrico formando o radical hidroxil ($\text{HO}\bullet$), altamente tóxico, através da reação de Fenton. Este radical hidroxil é um forte oxidante, e pode reagir com quase todas as moléculas dentro da célula incluindo DNA, RNA, proteínas e lípidos. A oxidação do DNA por radicais hidroxila induz lesões e mutações no DNA, que podem ter efeitos deletérios na célula (KIM et al., 2015).

Como uma faceta da resposta imune, os micro-organismos, em graus variados, são confrontados com ROS no decurso das infecções. Propõe-se assim, que as enzimas que contribuem para a desintoxicação de ROS, incluindo as SODs e catalases, tornam-se importantes fatores de patogenicidade microbianos. A SOD é uma enzima amplamente distribuída entre os organismos e estudada extensivamente em várias espécies. Ela protege a célula dos efeitos danosos de ROS pela efetiva conversão de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Elas são

metaloenzimas e são classificadas de acordo com o metal co-fator utilizado. As classes mais comuns em bactérias são compostas por manganês, ferro ou zinco, denominadas MnSODs e FeSODs e Cu-ZnSODs respectivamente, e são encontradas no citoplasma (HEINDORF et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio é um potente desinfetante com atividade bactericida. Sua forma vaporizada tem sido utilizada para controlar surtos de *A. baumannii* multirresistentes em instituições de saúde. Ele também tem uma função essencial na contenção de infecções bacterianas pelo sistema imune através dos fagócitos, desencadeando uma via de transdução de sinal que culmina na produção de uma substância bactericida, o ácido hipocloroso, pela mieloperoxidase. Esse processo é frequentemente referido como "explosão respiratória", e é crítico para a contenção e eliminação da infecção pelo sistema imune inato. Espécies de *A. baumannii* contém diversos genes que codificam catalases, assim como SOD, o que leva a um diferente fenótipo em relação à resistência ao estresse oxidativo (SUN et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, algumas espécies do gênero *Acinetobacter* vêm ganhando grande destaque, sendo alvo de diversos estudos, em especial, devido à sua capacidade de acumular genes/mecanismos de resistência a antimicrobianos e a condições ambientais adversas, bem como à sua associação com a ocorrência de surtos. Dentre elas, a espécie *A. baumannii* tem sido frequentemente recuperada em espécimes clínicos, estando envolvida na colonização e no desenvolvimento de doenças infecciosas diversas, especialmente em pacientes admitidos em UTIs, estando associada a altos índices de morbidade e mortalidade.

O sucesso das infecções por *A. baumannii* pode ser atribuído a diversos fatores de patogenicidade apresentados por essa espécie, como sua habilidade em formar biofilmes e resistir à dessecação em superfícies abióticas (dispositivos médicos e superfícies inanimadas); habilidade em aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas; seu repertório de mecanismos de resistência a antimicrobianos e sua habilidade em adquirir material genético de outros micro-organismos por transferência genética horizontal, promovendo sua sobrevivência sob pressão seletiva de antimicrobianos.

Sendo assim, cabe ressaltar a potencial contribuição desse estudo para o sistema de saúde, uma vez que os resultados apresentados irão possibilitar a ampliação do conhecimento acerca dos fatores de patogenicidade apresentados por linhagens de *A. baumannii* isolados em espécimes biológicos de pacientes hospitalizados, contribuindo com dados sobre a patogenicidade na colonização, invasão e progressão desse patógeno no ambiente hospitalar.

4 OBJETIVOS

Identificar a presença de fatores de patogenicidade em amostras de *Acinetobacter baumannii*, por parâmetros fenotípicos e genotípicos, recuperadas de pacientes com infecções diversas, internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar fatores de patogenicidade nas amostras de *A. baumannii* relativos ao:
 - Perfil genotípico: presença de genes associados à cápsula, biofilme, apoptose e *quorum sensing*).
 - Perfil fenotípico: indução de apoptose, produção de ROS e fagocitose em macrófagos; além da resistência ao peróxido de hidrogênio, atividade hemolítica e potencial zeta.
- Perfil clínico dos pacientes dos quais as amostras foram recuperadas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Etapa clínica

5.1.1 Delineamento do estudo e caracterização dos pacientes

Tratou-se de um estudo transversal, incluindo-se amostras de *Acinetobacter baumannii* obtidas de pacientes com infecções diversas, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), no período de agosto de 2012 a maio de 2013.

5.1.2 Variáveis consideradas na inclusão das amostras

- Realização de procedimentos invasivos durante a internação (broncoscopia, uretroscopia, colonoscopia, cirurgias de grande porte, dentre outros);
- Uso de dispositivos invasivos durante a internação (cateter vesical de demora, cateter venoso central, tubo orotraqueal, traqueostomia e outros);
- Ocorrência de infecção da corrente sanguínea/bacteremia correlacionando diretamente ou supostamente com o isolamento de *A. baumannii*;
- Presença de sepse;
- Internação em UTI;
- Óbito ou sobrevivência.
- Resistência a antimicrobianos (carbapenêmicos e, gentamicina ou tigeciclina ou ceftazidime ou ampicilina-sulbactam)

5.1.3 Aspectos éticos do estudo

Em um estudo anterior, esse trabalho foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital participante e do COEP/UFMG com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE)– 01402312.60000.5149 (ANEXO A). No caso de pacientes sem condições de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (como exemplo, pacientes sedados), o mesmo foi assinado por familiares ou responsáveis (ANEXO B).

5.2 Etapa laboratorial

5.2.1 Amostras bacterianas

Foram incluídas neste estudo 29 amostras clínicas de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos, recuperadas de diversos espécimes em pacientes com doença infecciosa, e uma amostra de referência, *A. baumannii* ATCC 19606.

As amostras clínicas foram submetidas à confirmação da identificação no nível de espécie (*A. baumannii*) pela presença do gene cromossômico *bla*_{OXA-51}. Além disso, elas tiveram a concentração inibitória mínima determinada pelo método de *Epsilon test* (E-test®), para os seguintes antimicrobianos: Ampicilina-Sulbactam (AB), Ceftazidime (CTZ), Gentamicina (GM), Meropenem (MP), Polimixina B (PO) e Tigeciclina (TGC). O perfil fenotípico e genotípico das 30 amostras avaliadas neste estudo está descritos no (ANEXO C).

Estas etapas foram realizadas em estudo anterior como parte de uma dissertação de mestrado desenvolvida no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, pelo mesmo grupo (FRANÇA, R. O. 2014).

As amostras de *A. baumannii* coletadas no âmbito da dissertação mencionada acima, juntamente com a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606, foram estocadas em freezer a -80°C, no meio líquido *Broth Heart Infusion* (BHI-DIFCO®) acrescido de 15% de glicerol.

5.2.2 Detecção de genes associados à patogenicidade

Os seguintes genes relacionados à patogenicidade em amostras de *A. baumannii* foram selecionados e pesquisados empregando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR):

- *ompA* e *omp33*, associados à indução de apoptose em células eucariotas;
- *bap*, associado à formação de biofilme em superfícies abióticas;
- *luxI* e *luxR* relacionados à produção de *quorum sensing* tipo "lactona homosserina N-acil (AHL);

- *wzc* que produz uma proteína tirosina quinase essencial ao processo de exportação da cápsula.
- *galU* que produz a proteína UTP-*glucose-1-phosphate uridylyltransferase*), que é um açúcar simples ligado a UDP, essencial ao processo de síntese da cápsula. Estes dois últimos genes foram escolhidos para amplificar regiões altamente conservadas, os quais estão presentes nos nove tipos diferentes de lócus K já descritos para *A. baumannii* (GEISINGER e ISBERG, 2015; KENYON e HALL, 2013).

Os *primers* correspondentes a cada gene em pesquisa, bem como as condições das reações estão descritos na Tabela 1. A amostra de referência de *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle positivo para todos os genes pesquisados.

5.2.3 Extração de DNA genômico e preparo do Master-mix

A extração do DNA das amostras de *A. baumannii* foi realizada de acordo com a metodologia do *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega). Brevemente, massas celulares das amostras foram obtidas a partir de um crescimento de 20 horas, em *Trypticase Soy broth* (TSB) DIFCO®, a 37°C. Posteriormente a cultura foi centrifugada por 2min, a 13.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e seguiram-se as orientações do protocolo.

A concentração de DNA obtida foi dosada em um NanoDrop®. A solução foi estocada em freezer a -20° C, até o momento do uso. Para as reações de PCR, o DNA foi diluído a 100ng/μL e mantido nas mesmas condições.

O kit Pré-Mix 2X (Phoneutria), contendo Taq DNA polimerase, os nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e MgCl₂, foi utilizado no estudo. Cada reação ocorreu com um volume final de 25μL sendo 12,5μL de Pré-Mix + *primers Forward* e *Reverse* + DNA bacteriano diluído + água livre de nuclease para completar o volume de 25μL.

5.2.4 Condições de amplificação e análise dos produtos amplificados por PCR

As condições de amplificação de cada gene estão descritas na Tabela 1. A eletroforese dos produtos obtidos pela PCR foi realizada em gel de agarose 1%, para as bandas de 100 a 400pb, e 1,5% para as bandas de 400 a 700pb (tampão

Tris/Borato/EDTA [TBE]). Os *amplicons* obtidos foram corados com Gel red (Biotium, USA) e aplicados no gel de agarose, assim como o padrão de DNA de 100pb DNA *ladder* (Promega[®], MADISON-WI USA). As corridas foram de aproximadamente, 120 minutos a 90 volts. As imagens foram capturadas sob luz ultravioleta em um fotodocumentador.

Tabela 1 - Sequência de bases, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de determinantes genéticos de fatores de patogenicidade

Gene	Fator de patogenicidade	Sequência de bases (5'-3')	Condições de amplificação	Amplicon	Referência
<i>bap</i>	Formação de biofilme	PF 5'- TGCTGACAGTGACGTAGAACCACA - 3' PR 5' - TGCAACTAGTGGAAATAGCAGCCCA - 3'	Desnaturação inicial 95°C, 2 min; 30x: 95°C, 45s; 61°C, 45s; 72°C, 1min	184pb	BROSSARD et al. (2012)
<i>ompA</i>	Indução de apoptose em células do hospedeiro	PF 5' - GATGGCGTAAATCGTGGA - 3' PR 5'- CAACTTTAGCGATTCTGG - 3'	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 45s; 57°C, 45s; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 5 min	355pb	TURTON et al. (2007)
<i>omp33</i>	Indução de apoptose em células do hospedeiro	PF 5' - CAAGTGTGCTAACCAATTCGCT - 3' PR 5'- GTTTTCTTGACCGAATGCACC- 3'	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 45s; 65°C, 45s; 72°C, 1min	194pb	RUMBO et al. (2014)
<i>luxI</i>	<i>Quorum sensing</i>	PF 5'- GGTTGGGAG TTGAACTGTCC - 3' PR 5'- AAACGTTCTACTCCAAGAGG - 3'	Desnaturação inicial 95°C, 2 min, 30x: 95°C, 45s; 58°C, 45s; 72°C, 1min	370pb	BITRIAN et al. (2012)
<i>luxR</i>	<i>Quorum sensing</i>	PF 5'- TCGGATTTGATTATTGCG CTTATG - 3' PR 5'- ACAGCTCGAATAGCTGCTG - 3'	Desnaturação inicial 95°C, 2 min, 30x: 95°C, 45s; 58°C, 45s; 72°C, 1min	603pb	BITRIAN et al. (2012)
<i>ptk (wzc)</i>	Cápsula	PF 5'- CTCCACCAGTGCTTGACAGTA - 3' PR 5' - CAGCGCTAGCACGTTGAATA - 3'	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 45s; 60°C, 45s; 72°C, 1min	183pb	GEISINGER e ISBERG (2015)
<i>gaiU</i>	Cápsula	PF 5'- AGCCAAGCTGCTCAAATCAT- 3' PR 5'- CGGCCAACACAGATAAGTT- 3'	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 45s; 60°C, 45s; 72°C, 1min	170pb	GEISINGER e ISBERG (2015)

5.3 Detecção fenotípica de fatores de patogenicidade

5.3.1 Avaliação da patogenicidade em macrófagos por linhagens de *A. baumannii*

A avaliação fenotípica da patogenicidade em macrófagos foi realizada segundo o protocolo definido por Smani et al. (2011).

Estes ensaios foram executados com 20 amostras, sendo uma de referência (ATCC 19606) e 19 amostras que apresentaram perfis de semelhança genética de mais de >50% nas análises de ERIC-PCR realizadas no estudo anterior de Rafaela (FRANÇA, R. O. 2015). As células eucarióticas utilizadas foram macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).

a) Obtenção de macrófagos da medula óssea

As células utilizadas nesse estudo foram os macrófagos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c, que foram gentilmente cedidos pelo Professor Ricardo Gonçalves do Laboratório de Patologia das Leishmanioses do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de isolamento de macrófagos da medula óssea de Gonçalves e Mosser (2015). Resumidamente, células precursoras retiradas da medula óssea foram coletadas e cultivadas em meio RPMI completo: RPMI (*Sigma-Aldrich*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor, com adição de 20% de sobrenadante de células da linhagem L929, que contém Fatores de crescimento, de penicilina (50µg/ml), estreptomicina (20µg/ml), L-glutamina (100mmol/L); piruvato (100mmol/L), em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C. Após três dias foram adicionados às culturas mais 10mL de meio completo. Cerca de oito a dez dias após o isolamento das células medulares, os macrófagos, já diferenciados, ficaram aderidos na superfície da placa, e as células não aderentes presentes na superfície foram então eliminadas. Esse isolamento de BMDM foi feito a cada experimento realizado.

b) Linhagens de *A. baumannii* para infecção

Dezenove amostras clínicas de três clados distintos (A, B e C), e a de *A. baumannii* ATCC 19606 foram selecionadas para a execução deste experimento, em duplicata.

Cada clado escolhido apresentava perfis de similaridade >50% entre as suas amostras, sendo que destas, sete amostras: 16 e 19; 8 e 9; 48, 50 e 51, apresentavam perfis de bandas idênticos entre si. A amostra *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle.

Clado A: amostras: 5,16, 19, 21, 37, 43, 47

Clado B: amostras 6, 8, 9, 10, 27, 32, 34, 35

Clado C: 31, 48, 50, 51

As amostras bacterianas foram descongeladas e incubadas em 5mL de meio *TrypticSoyBroth* (DIFCO®) por 24h a 37°C. Posteriormente foram centrifugadas a 10000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em meio RPMI completo sem antimicrobianos. Para mensuração da densidade bacteriana utilizou-se escala 0,5 *McFarland* ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Em seguida foram realizadas as diluições necessárias. Uma alíquota de 100µL de cada diluição foi utilizada no experimento.

c) Cultivo celular em lamínulas de vidro

Os macrófagos BMDM foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro, colocadas dentro de placas para cultura de células de 24 poços (diâmetro dos poços: 16mm), em meio RPMI completo sem antimicrobianos, em uma estufa umidificada a 97%, a 37°C e com 5% de CO₂. Eles foram plaqueados a uma densidade de 5×10^4 células por poço em 100µL e após 1h de adesão, foram acrescentadas as culturas bacterianas na concentração de 5×10^6 , sendo o índice de multiplicidade de infecção (MOI) de 100. O experimento foi realizado em duplicata e o cultivo celular sem inóculo bacteriano foi utilizado como controle negativo. As lamínulas foram removidas para observação no tempo de 24h. Após o período de incubação as lamínulas foram coradas com panótico e fixadas em lâminas de microscopia para avaliação em microscopia de captura.

d) Contagem celular

As células foram fotografadas em microscópio de captura (15 campos por lamínula), utilizando-se o programa *QCapture Pro 7* e contadas através do *software ImageJ*.

5.3.2 Avaliação de apoptose em macrófagos por citometria de fluxo

Para o ensaio de apoptose, utilizou-se o kit AlexaFluor® 488 *annexin/ Dead Cell Apoptosis* da Invitrogen para citometria de fluxo (FACS), segundo protocolo recomendado.

Três amostras bacterianas foram testadas em duplicata, sendo: 01 amostra *ompA* e *omp33* negativa (amostra 06); 01 amostra *ompA* negativa e *omp33* positiva (amostra 05), 1 amostra controle *A. baumannii* ATCC 19606 (*ompA* e *omp33* positivas). O isolamento dos macrófagos e o ajuste dos inóculos bacterianos foram realizados como já descrito no item 5.3.1., sendo as concentrações utilizadas por reação de 1×10^6 macrófagos para 1×10^8 UFC/ml de bactérias (MOI:100). O tempo de incubação foi de 03 horas. Foi preparado um controle negativo através da incubação das células sem o agente indutor (amostras de *A. baumannii*) e um controle positivo através da exposição dos macrófagos à luz ultravioleta por 30 minutos em capela de fluxo laminar.

Após o período de incubação, as células do controle negativo e as inoculadas foram lavadas com PBS gelado. As amostras foram centrifugadas a 300xg por 3min, lavadas novamente com PBS gelado e re-centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em *1X annexin-binding buffer*. Foram adicionados 5µL de Alexa Fluor® 488 annexin AV e 1µL(100 µg/mL) de iodeto de propídio para cada 100 µL de suspensão celular.

As células foram incubadas à temperatura ambiente por 15min. Após este período foram adicionados, gentilmente, 400µL de *1X annexin-binding buffer* e as amostras foram colocadas no gelo. Imediatamente após o experimento procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo BD FACS Calibur™.

5.3.3 Avaliação de fagocitose por macrófagos em citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado segundo o protocolo de Manoir et al. (2002) em dois experimentos independentes, em duplicata. Objetivou-se avaliar se existe alguma diferença na taxa de fagocitose entre as linhagens bacterianas avaliadas. Os macrófagos BMDM utilizados foram isolados como descrito no item 5.3.1.

A taxa de fagocitose foi avaliada pela marcação bacteriana com o corante carboxi fluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE). CFSE é um corante fluorescente permeável à membrana celular com propriedades de excitação e emissão semelhantes ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). Assim CFSE pode ser utilizado em citometria de fluxo pelos mesmos canais que detectam a intensidade de fluorescência de FITC. O precursor de CFSE, éster de succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE), que é utilizado para marcar células, não é fluorescente, mas uma vez dentro de células, os grupos de acetato são removidos por esterases intracelulares, fazendo com que a molécula de CFSE resultante se torne fluorescente e também menos permeável à membrana.

a) Linhagens de *A. baumannii* para infecção

Dez amostras bacterianas foram selecionadas para este experimento: nove amostras clínicas e uma de referência *A. baumannii* ATCC 19606.

As nove amostras clínicas selecionadas (5, 6, 10, 16, 17, 31, 32, 48 e 50) foram as que se destacaram em algum ensaio relacionado à patogenicidade, ou seja, ou demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606, ou nos testes de potencial zeta, ou na indução de apoptose e tolerância ao estresse oxidativo, ou foram ausentes para o gene relacionado à cápsula (*wzc*).

Os inóculos bacterianos foram preparados como já descrito no item 5.3.1.

b) Ensaio de fagocitose

A taxa de fagocitose foi avaliada pela marcação bacteriana com CSFE. A incubação das amostras com o corante foi feita por 10min à 37°C em PBS. Depois foi realizada uma lavagem com PBS a 37°C e acrescentou-se solução de SFB a 10% para a captação do CFSE que não penetrou nas células bacterianas. Em seguida

acrescentou-se a cada um dos tubos células na concentração de 1×10^5 macrófagos/mL e as amostras teste em concentrações de 1×10^7 UFC/mL (MOI:100). As células foram incubadas por 30min a 37°C para avaliar a ocorrência de fagocitose das bactérias. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos para o gelo. Imediatamente após o experimento procedeu-se à leitura da fluorescência do CFSE em citômetro de fluxo BD FACS Calibur™.

Foi utilizado como controle negativo: macrófagos + bactérias não marcadas com CFSE e macrófagos sem bactérias.

5.3.4 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado segundo o protocolo de Manoir et al. (2002) em dois experimentos independentes, em duplicata. As amostras bacterianas foram as mesmas utilizadas no ensaio de fagocitose, descritas no item 5.3.3.

A medida da produção de ROS foi avaliada pela oxidação do fluorocromo intracelular *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA), um éster não-fluorescente, que ao difundir na célula é transformado pelas esterases celulares em um composto intermediário (DCFH), que é então oxidado por ROS e produz um composto altamente fluorescente, o DCF, que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. A fluorescência gerada por DFC é diretamente proporcional à quantidade de ROS produzido.

a) Ensaio da produção de ROS induzida por amostras de *A. baumannii*

As amostras bacterianas utilizadas neste ensaio foram ajustadas na concentração de 1×10^8 UFC/mL e os macrófagos, 1×10^6 /mL (MOI:100). Primeiramente os macrófagos foram ressuspensos em PBS e incubados, no escuro, com as amostras bacterianas, para estimular a produção de ROS, e DCFH, por 30min a 37°C . Após este período, os tubos foram transferidos para o gelo para interromper a reação. Imediatamente após o experimento procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo BD FACS Calibur™.

Nesse experimento foram utilizados controles com macrófagos não marcados com DCFH-DA e macrófagos marcados com DCFH-DA, porém sem incubação com bactérias.

5.3.5 Avaliação da tolerância ao peróxido de hidrogênio por disco-difusão

O teste da tolerância ao peróxido de hidrogênio em amostras de *A. baumannii* foi avaliado segundo a metodologia descrita por Heindorf et al. (2014).

a) Preparo do inóculo

Pré- inóculos bacterianos foram obtidos após 20 horas de crescimento em ágar TSA a 37°C. As amostras foram ajustadas na escala 0,5 *Mc Farland* em salina 0,85% estéril.

As suspensões bacterianas foram uniformemente espalhadas sobre a superfície de placas de ágar *Mueller-Hinton* (BD-Difco), com o auxílio de um *swab*. Na sequência, cinco discos de papel filtro padronizados (Cecon) foram dispostos em cada placa e inoculados com 5µL de solução de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações cada um. As concentrações utilizadas foram: 1%, 5%, 10%, 20%, e um disco com água mili-Q estéril. Após 20h de crescimento a 37°C, os halos de inibição formados em torno dos discos de papel foram medidos em milímetros (mm).

b) Interpretação dos resultados

Foram realizados três experimentos independentes e a média dos halos obtidos em (mm) foi utilizada para as análises estatísticas.

5.3.6 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tayabali et al. (2012).

a) Preparo do inóculo

As suspensões bacterianas foram ajustadas na escala de 0,5 de *Mc Farland*, e, posteriormente, foi transferido 10µL dessa suspensão para o replicador de *Steers*. As amostras foram então inoculadas na superfície de placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) DIFCO® suplementado com 5% de sangue, com o replicador de *Steers*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

b) Interpretação dos resultados

Neste teste foram utilizados seis diferentes tipos sanguíneos: carneiro, cavalo e humano (O, A, B, AB), sendo os de procedência humana de fator Rh positivo.

Após este período foi avaliada a capacidade hemolítica de cada linhagem. A observação de uma zona clara/transparente ao redor do crescimento bacteriano indica β -hemólise e a de halo esverdeado, α -hemólise. Ausência de halo representa nenhuma atividade hemolítica. Os testes foram realizados em duplicata.

As amostras de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *K. pneumoniae* ATCC 13882 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

5.3.7 Mensuração do potencial Zeta

A medida do potencial zeta é uma medida da carga elétrica total da superfície celular, a qual depende de vários fatores como a composição da superfície celular e características do meio ao qual ela está inserida. Estudos recentes têm relacionado a carga total celular com a resistência a antimicrobianos, especialmente à colistina. Ademais, a formação de biofilme está diretamente associada a esta medida, uma vez que as interações eletrostáticas entre um material e a superfície bacteriana é o primeiro passo para a implantação do biofilme. Além disso, em outros microorganismos, como *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica* essa carga total da superfície celular se relaciona com a resistência a fagocitose por fagócitos (SOON et al., 2011; HALDER et al., 2015; NOMURA et al., 1995; JOSHUA e CASADEVALL, 1997).

O aparelho utilizado nestes ensaios possibilita a determinação do potencial zeta das partículas utilizando o princípio básico do espalhamento da luz gerado por uma fonte de luz branca. Neste, uma diferença de potencial é aplicada na solução contendo o material em estudo. As partículas ou as bactérias, em virtude da diferença de potencial e do pH irão migrar para o catodo ou anodo numa velocidade que é proporcional ao campo elétrico aplicado. Através de um microscópio focado na célula é possível observar as partículas ou as bactérias em movimento e medir o tempo que uma determinada partícula gasta para percorrer a distância de uma ou mais quadrículas da escala acoplada a lente do microscópio. A partir do tempo

medido, o equipamento calcula instantaneamente a velocidade média da partícula, a mobilidade eletroforética e o potencial zeta.

O objetivo dessa mensuração foi tentar correlacionar a carga superficial celular com as taxas de fagocitose. Para isso, foi seguido o protocolo de Soon et al. (2011). Resumidamente, as amostras foram crescidas em ágar TSA por 18h a 35°C. Após esse período, uma colônia foi ressuspensa em PBS e ajustada na escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). As células suspensas foram transferidas para cuvetes de plástico com um caminho ótico de 1cm acoplado a eletrodos (Malvern, Cell Dolded Capillary DTS1060). As mensurações do potencial Zeta foram realizadas utilizando um equipamento Malvern Zetasizer Nano Z S e foi determinada por meio da técnica de Micro-eletroforese Laser Doppler, com um ângulo de dispersão de 173°, utilizando um capilar descartável de células dobradas (DPS1060). Os valores foram calculados como a média de dez medições independentes, cada uma obtida como média de 30 contagens.

5.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *Software Prism 5 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA)* e do *Software SPSS statistics*.

Os testes empregados para as análises comparativas e de associação (exceto para teste de estresse oxidativo) foram: para avaliar a distribuição dos dados (Kolmogorov-Smirnov test, D'Agostino and Peasron e Dhapiro-Wilk); para análise da variância: teste ANOVA seguido do teste de Tukey (paramétrico) ou teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn (não-paramétrico).

Para as análises estatísticas do ensaio da resistência ao peróxido de hidrogênio, o programa *Stata* versão 12.0 (STATA Corp. TX, USA) foi utilizado. O tamanho do halo de inibição (em milímetros) foi considerado a variável resposta ou variável dependente; as concentrações testadas e as diferentes amostras microbianas foram as variáveis independentes. Escolheu-se a análise de regressão linear para comparar a variável resposta com as variáveis independentes: concentração (1%, 5%, 10% e 20%) e trinta amostras (29 amostras clínicas e uma de referência).

Para todos os testes realizados, considerou-se como significativo valor $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Perfil clínico e demográfico dos pacientes do estudo

As amostras de *A. baumannii* caracterizadas nesse estudo foram provenientes de 20 pacientes distintos. Do total, 50% eram do sexo feminino e 50% do sexo masculino, com média de idade de 60,6 anos. A média da duração da internação foi de 61,5 dias. Todos os pacientes possuíam algum tipo de comorbidade durante a internação, sendo Insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (35%) e imunossupressão (30%) as mais prevalentes (TABELA 2).

Tabela 2 - Frequência das comorbidades dos pacientes incluídos no estudo

Comorbidade (n=20)	Frequência	%
ICC	7	35%
Imunossupressão	6	30%
Diabetes mellitus	5	25%
IRC	5	25%
Neoplasia- hematológica	5	25%
Cirrose	2	10%
Dilíase	2	10%
DPOC	1	5%
Músculo-degenerativa	1	5%
Neoplasia- órgão sólido	1	5%
Úlcera por pressão	1	5%
Acamado	1	5%

Legenda: ICC: Insuficiência cardíaca congestiva; IRC: Insuficiência renal crônica; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

Oitenta por cento deles estiveram sob cuidados intensivos (CTI/UTI), com média de duração de 17 dias. Em algum momento da internação, 95% fizeram uso de dispositivos invasivos, sendo que 75% foram submetidos à ventilação mecânica (TABELA 3).

Tabela 3 - Perfil de internação dos pacientes do estudo

Perfil de internação	Frequência	%
Internação em UTI/CTI	16	80%
Uso de dispositivos invasivos	19	95%
Ventilação mecânica	15	75%
Traqueostomia	7	35%
Hemodiálise	7	35%

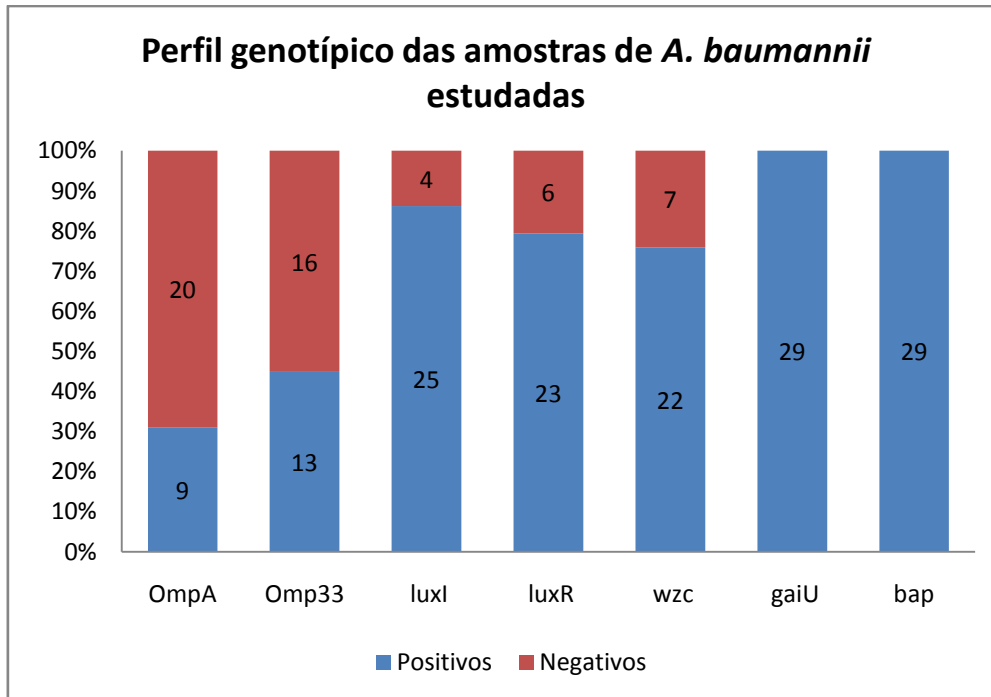
Todos os pacientes fizeram uso de algum tipo de antimicrobiano durante a internação, com média de duração de 31,6 dias. Ademais todos os pacientes também apresentaram sepse em algum momento da internação, sendo que destes, 65% tiveram a confirmação do *A. baumannii* como agente etiológico, e 7 (35%) tiveram este micro-organismo como suspeito da etiologia da sepse.

Em relação ao desfecho clínico dos 20 pacientes do estudo, 05 (25%) foram a óbito, sendo que em 03 deles o choque séptico foi a causa.

6.2 Detecção de genes associados à patogenicidade

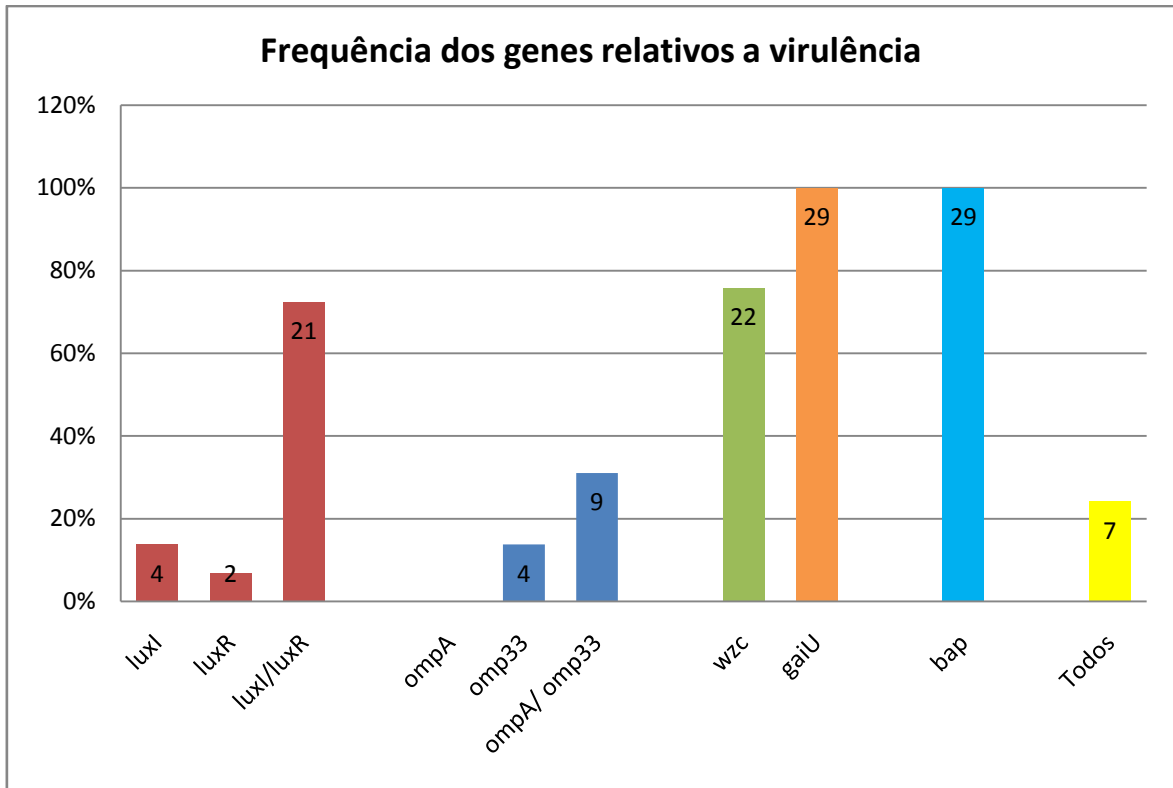
Das 29 amostras avaliadas nesse estudo, todas foram positivas para o gene *bap*, relativo à formação de biofilme, e *gaiU*, relativo à cápsula. Também em relação a esta, 22 foram positivas para *wzc*; 13 foram positivas para o gene *omp33*, relacionado à indução de morte celular; em relação ao *quorum sensing*, 25 foram positivas para o gene *luxI* e 23 para o gene *luxR* (GRÁFICO 1). O perfil genotípico de cada amostra está representado no ANEXO C.

Gráfico 1 - Perfil genotípico de fatores associados à patogenicidade das amostras clínicas de *A. baumannii*



O gráfico 2 representa a frequência dos genes pesquisados e suas combinações nas amostras de *A. baumannii*, em relação a *quorum sensing*, OMPs, cápsula e biofilme. Percebe-se que 24% das amostras (n=7) apresentam todos os genes pesquisados relacionados à patogenicidade. No que se refere a *quorum sensing*, 14% das amostras (n=4) apresentam somente *luxI*, 7% (n=2) somente *luxR* e 72% (n=21) das amostras possuem ambos. Em relação à cápsula, 76% (n=22) apresentam o gene *wzc* e todas as amostras apresentam o gene *gaiU* e também o *bap*, relacionado à formação de biofilme. Por fim, referente às OMPs, 14% foram positivas somente para *omp33* e 31% para as duas.

Gráfico 2 - Frequência dos genes relacionados à patogenicidade e suas combinações (n=29)

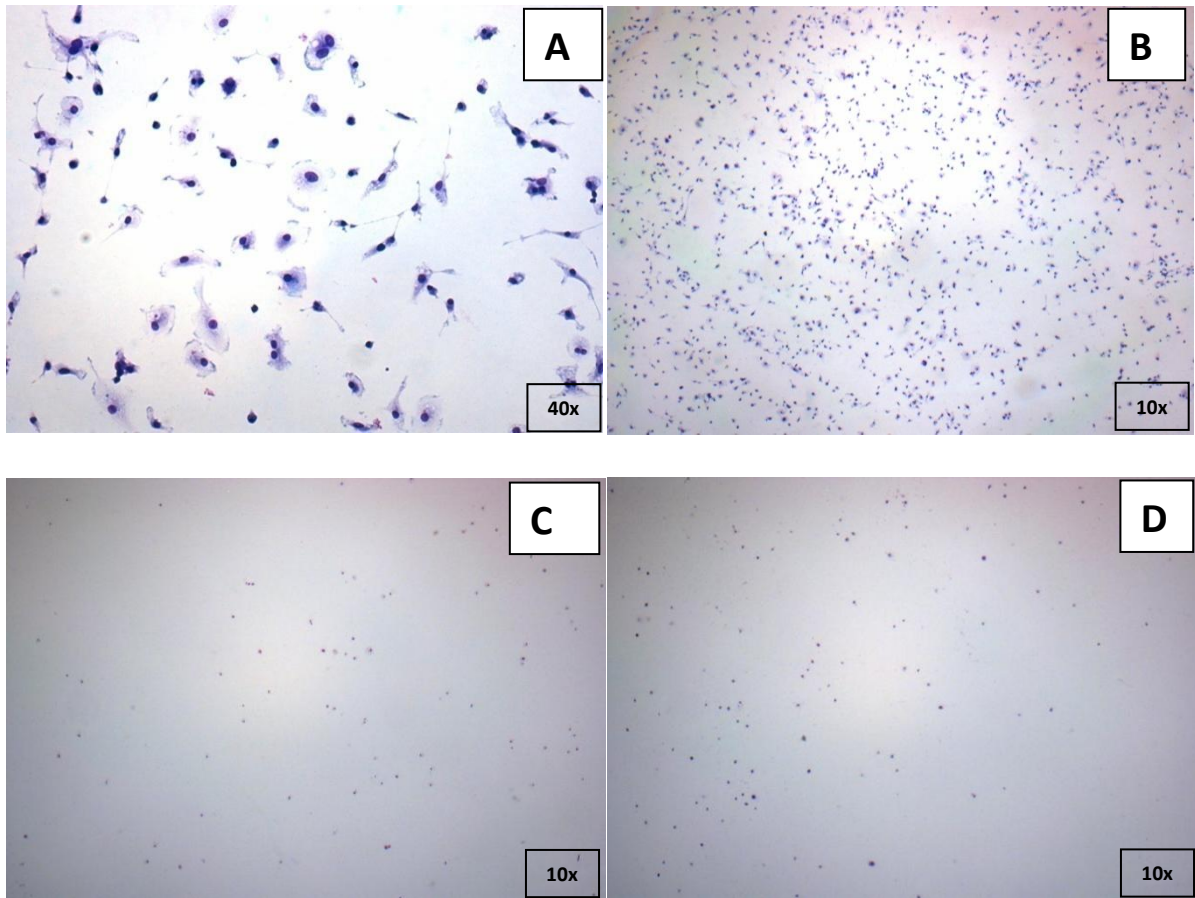


6.3 Detecções fenotípica de fatores de patogenicidade

6.3.1 Avaliação de morte celular induzida por linhagens de *A. baumannii*

A figura 3 ilustra o ensaio em lamínulas para a verificação da morte celular após a inoculação de diferentes amostras de *A. baumannii* em macrófagos derivados da medula óssea no tempo de 24h.

Figura 3 - Infecção de macrófagos BMDM por *A. baumannii* em lamínulas de vidro após 24h de infecção.



Legenda: Controle de células sem inóculo bacteriano por 24h (A e B) de incubação. Após 24h de incubação com a amostra 06 (C) e 32 (D) de *A. baumannii*

Os gráficos seguintes (GRÁFICOS 3 e 4) apresentam os resultados dos ensaios de cultura de células em lamínulas de vidro com o inóculo das amostras clínicas e de referência avaliadas, sendo a multiplicidade de infecção (MOI) de 100 e o tempo de 24h.

Gráfico 3 - Densidade celular após a infecção de macrófagos com linhagens de *A. baumannii*, representando as amostras nas quais se observou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem inóculo bacteriano)

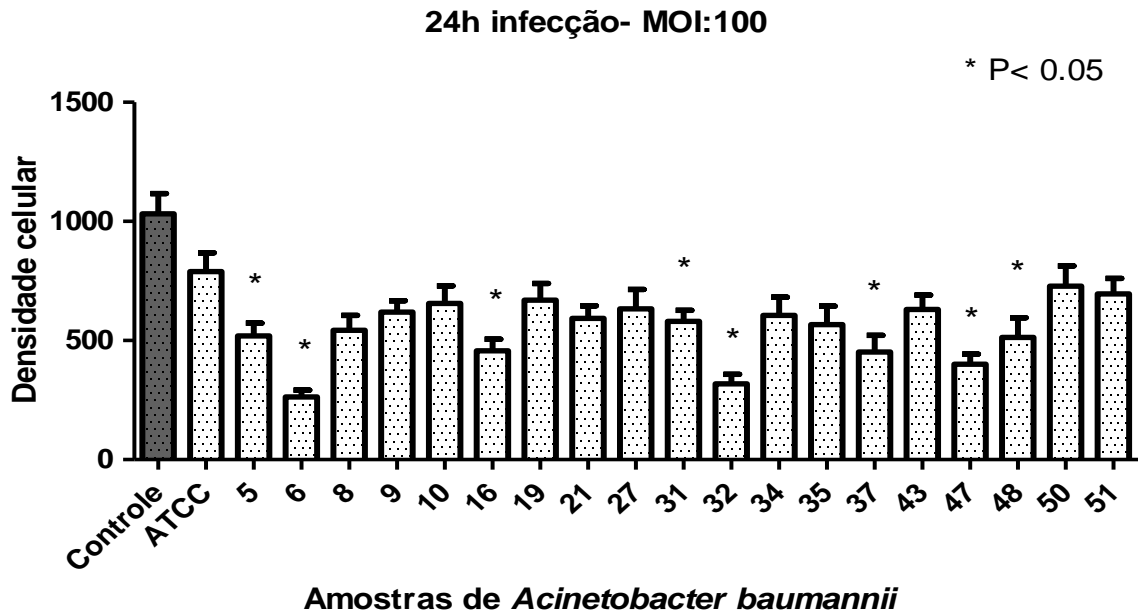
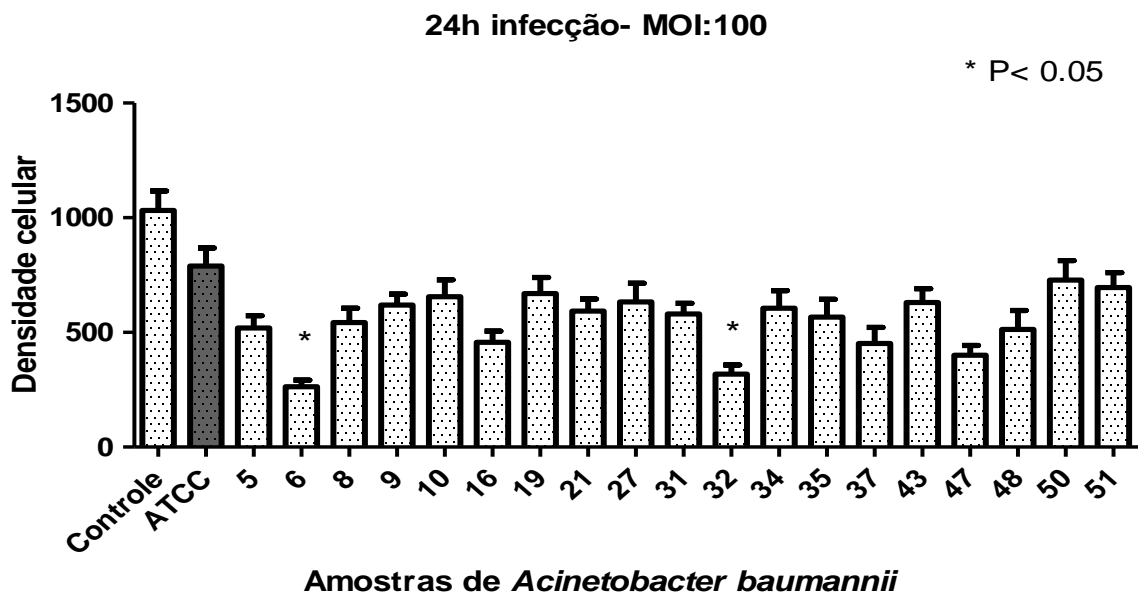


Gráfico 4 - Densidade celular após a infecção de macrófagos com linhagens de *A. baumannii*, representando as amostras das quais se observou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência.



Em 24h de incubação, percebe-se que houve diminuição da densidade celular de macrófagos com todas as linhagens de *A. baumannii* avaliadas, inclusive com a amostra de referência, porém algumas sem significância estatística.

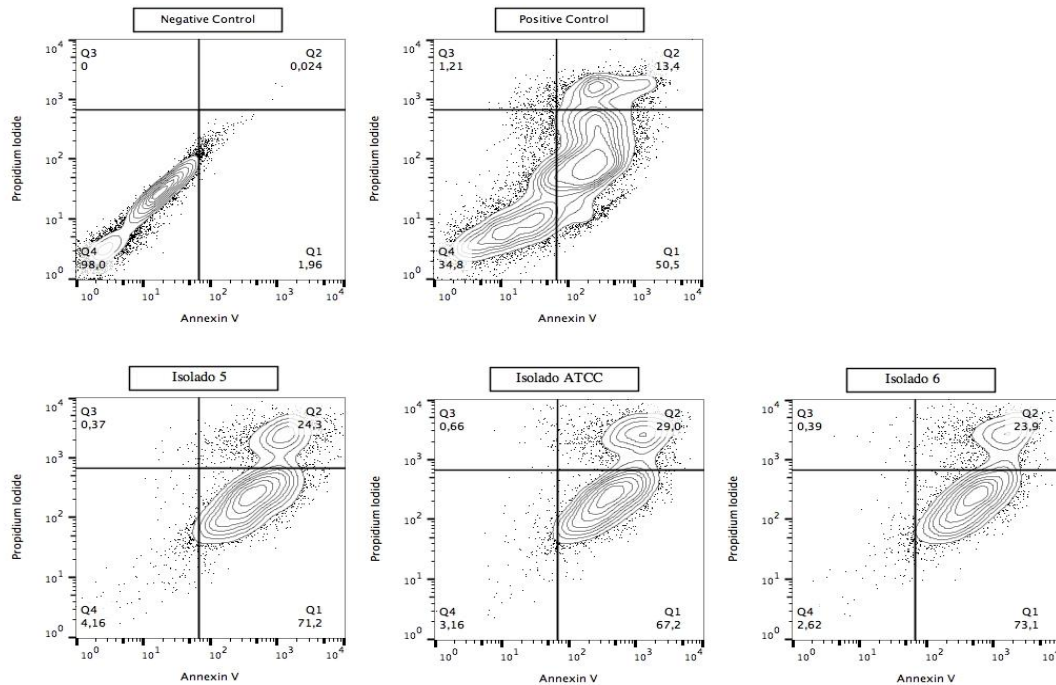
Somente houve uma redução na densidade celular de macrófagos, significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, após a incubação com as amostras bacterianas 05, 06, 16, 31, 32, 37, 47 e 48.

Por outro lado, quando se compara a diminuição da densidade celular de macrófagos após a infecção com a amostra de referência, *A. baumannii* ATCC 19606 versus as amostras clínicas, houve significância estatística somente com as amostras 06 e 32.

6.3.2 Avaliação de apoptose em macrófagos por citometria de fluxo

Este ensaio avaliou três amostras bacterianas em duplicata, sendo: 01 amostra *ompA* e *omp33* negativa (amostra 06); 01 amostra *ompA* negativa e *omp33* positiva (amostra 05), 1 amostra controle *A. baumannii* ATCC 19606 (*ompA* e *omp33* positivas), quanto à indução de apoptose em macrófagos. Diante dos resultados, percebeu-se que houve a indução de apoptose nos macrófagos depois da incubação com as 03 amostras, com diferenças não significativas ($p > 0,05$). A figura 4 representa a análise de apoptose induzida em macrófagos por *A. baumannii* através da citometria de fluxo. *Countorn Plots* representativos de um controle negativo, um controle positivo, e 03 amostras de *A. baumannii*, mostrando a indução de apoptose em macrófagos em cultura, através da expressão de Anexina V e Iodeto de propídio.

Figura 4 – Análise de apoptose induzida em macrófagos por *A. baumannii* através da citometria de fluxo

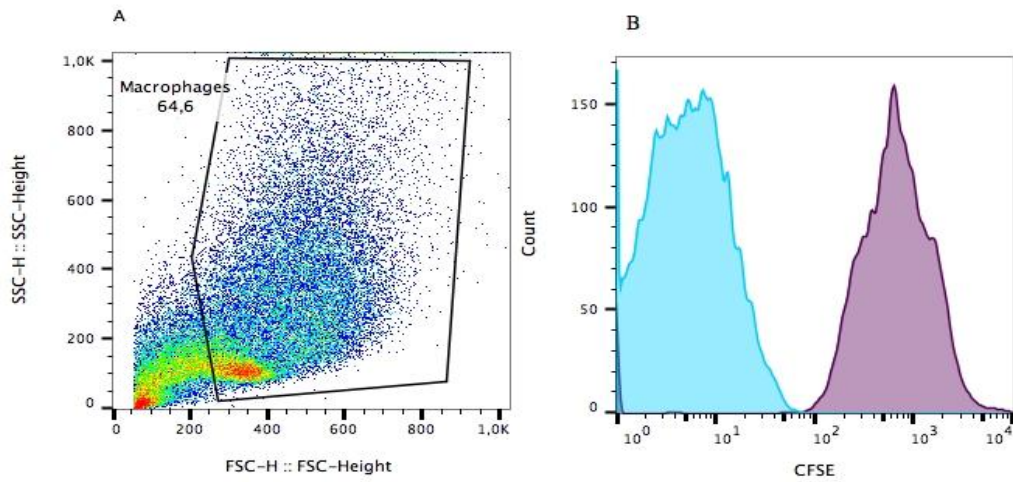


6.3.3 Avaliação de fagocitose por macrófagos em citometria de fluxo

Neste ensaio foi avaliada a taxa de fagocitose entre as amostras de *A. baumannii*. As nove amostras clínicas selecionadas (5, 6, 10, 16, 17, 31, 32, 48 e 50) foram as que demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em relação à amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606, nos testes de potencial zeta, indução de apoptose e tolerância ao estresse oxidativo, além da ausência do gene relacionado à cápsula (*wzc*).

Nesse ensaio, todas as amostras avaliadas foram fagocitadas pelos macrófagos, em diferentes taxas e, apesar dessa diferença ser marcante para as amostras 06, 10 e 48, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). A figura 5 representa a análise de fagocitose por citometria de fluxo. Em (A) temos o *Dotplot* representativo da população de macrófagos. Em (B) temos o histograma representativo do ensaio de fagocitose mostrando a população positiva para CFSE em roxo em comparação com o controle negativo em azul.

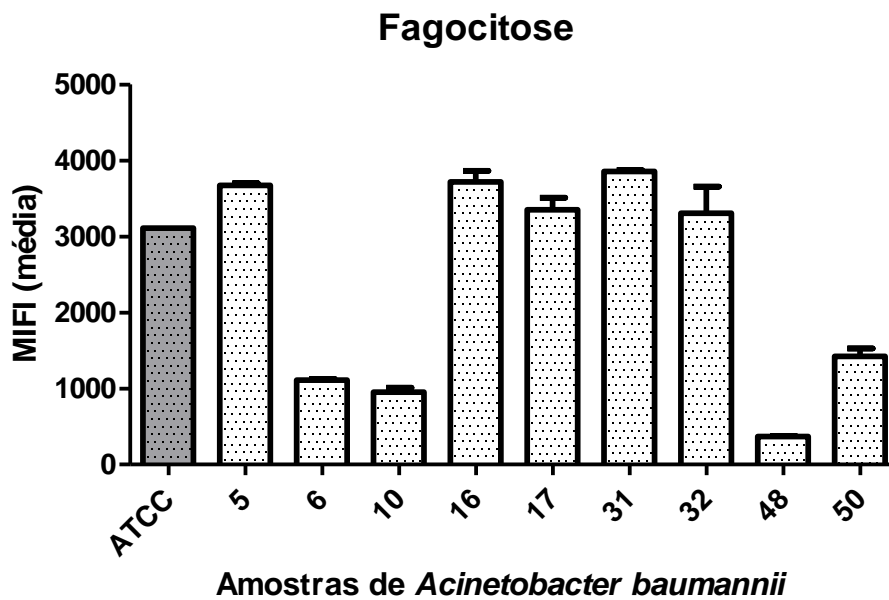
Figura 5 - Análise de fagocitose por citometria de fluxo



Legenda: SSC – Side Scatter; FSC Foward Scatter

O gráfico 5 representa a média da fluorescência emitida para cada amostra de *A. baumannii*. Ela reflete as diferentes taxas de fagocitose das bactérias.

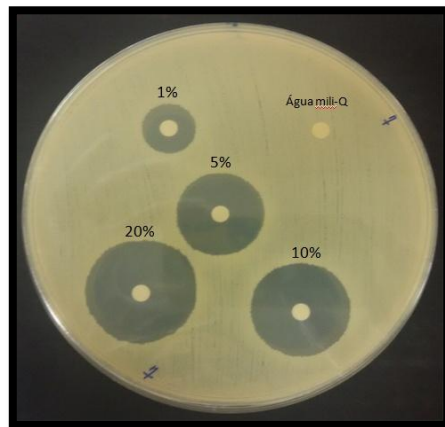
Gráfico 5 - Taxa de fagocitose das amostras de *A. baumannii* analisadas



6.3.4 Avaliação da tolerância ao peróxido de hidrogênio por disco-difusão

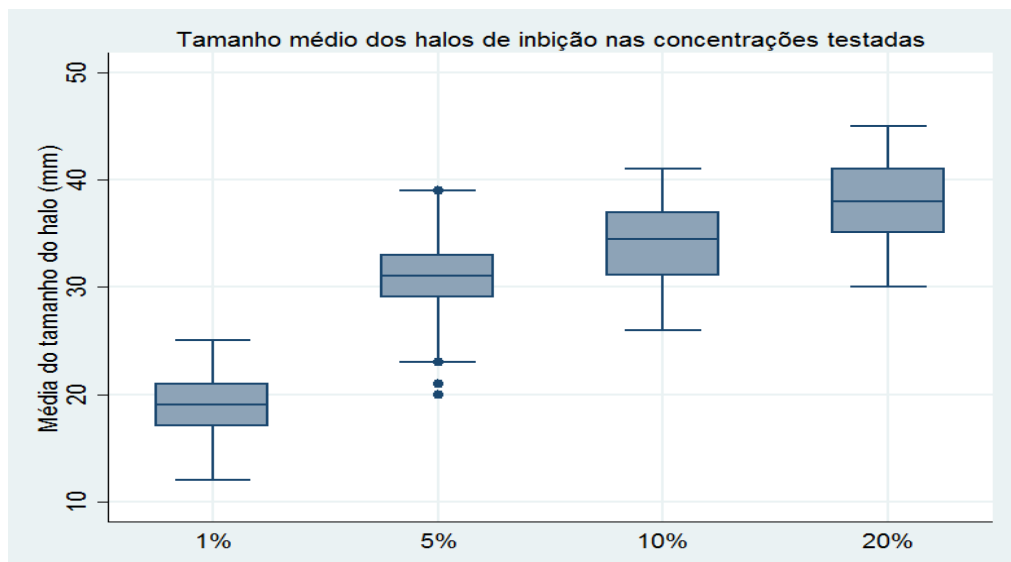
A avaliação da tolerância ao estresse oxidativo (FIGURA 6) das linhagens de *A. baumannii* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio demonstrou que a amostra de referência apresentou média de halo de inibição semelhante ao de algumas amostras clínicas. Entretanto, a maior parte das amostras testadas (n=20) mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 6 - Teste do estresse oxidativo e respectivas concentrações de peróxido de hidrogênio (1%, 5%, 10% e 20%)



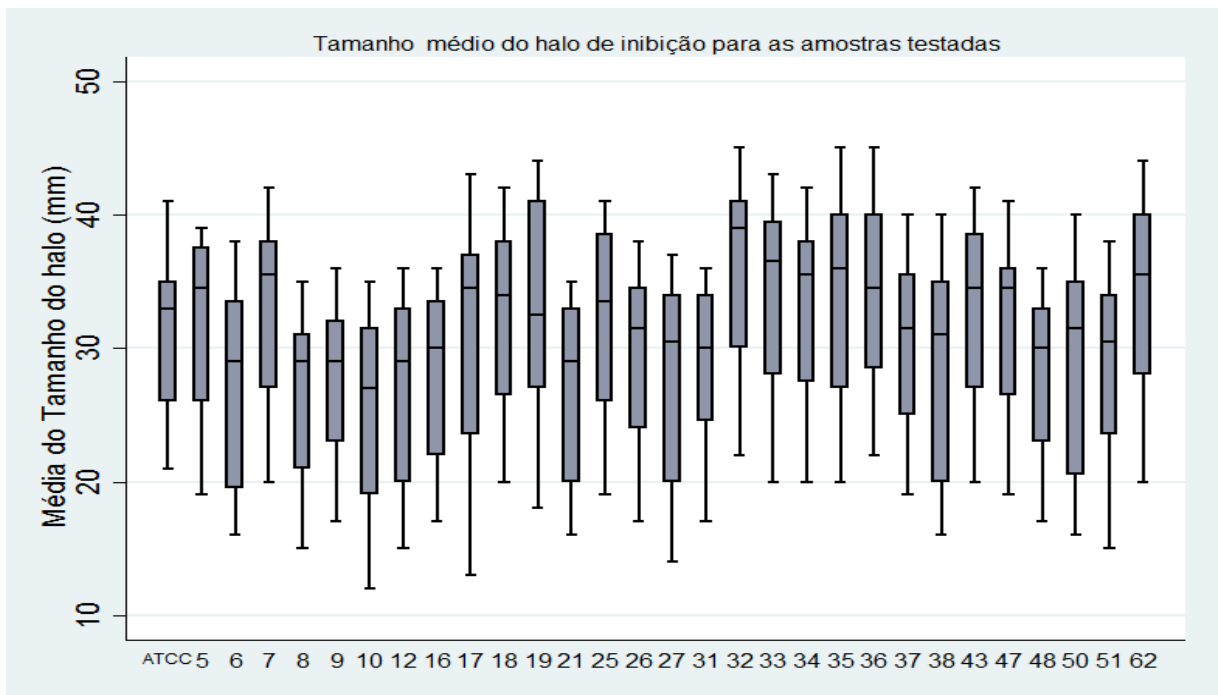
A média dos halos de inibição de cada concentração estão representadas no (GRÁFICO 6)

Gráfico 6 - Média do tamanho dos halos de inibição nas quatro concentrações testadas



A média de todas as concentrações testadas para cada amostra está representada no (GRÁFICO 7). Pode-se inferir que as amostras que obtiveram as menores médias dos diâmetros dos halos foram as mais resistentes, de um modo geral, às várias concentrações testadas. Por outro lado, as amostras com médias dos diâmetros dos halos maiores foram as mais susceptíveis ao estresse oxidativo.

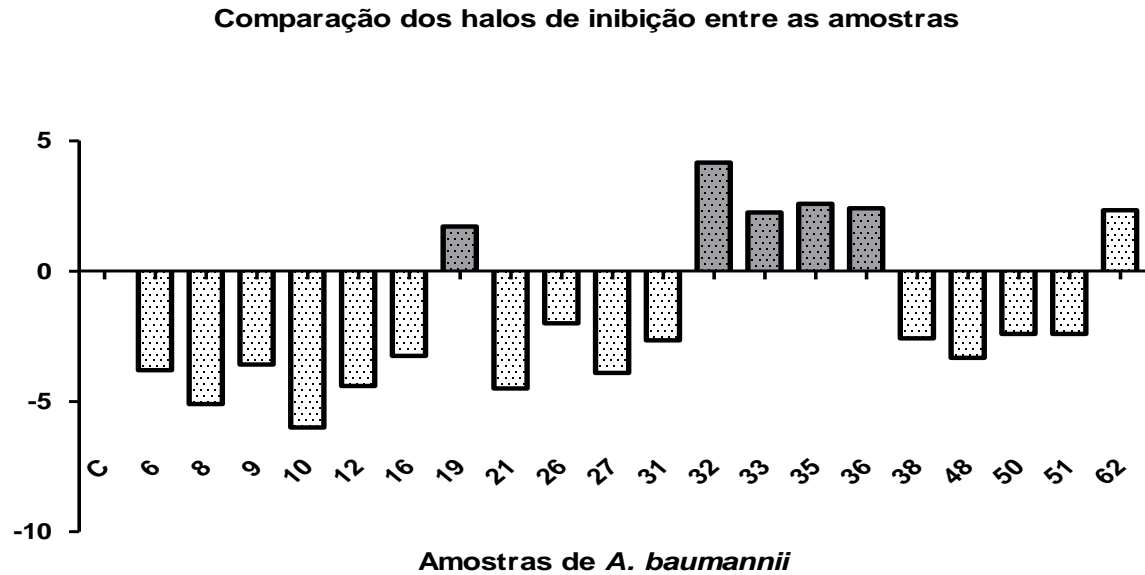
Gráfico 7 - Média do tamanho dos halos de inibição para as trinta amostras testadas



O (GRÁFICO 8) representa uma melhor visualização do contexto geral deste ensaio. Quando se compara as amostras clínicas com a amostra de referência, com significância estatística ($p < 0,05$), pode-se observar que se determinarmos uma constante para os halos referentes a todas as concentrações testadas na amostra de referência e atribuirmos a ela o valor zero, algumas amostras clínicas possuíam halos menores ou maiores. Por exemplo, as amostras 19, 32, 33, 35, 36 e 62 possuem média dos halos maiores que o da ATCC, ou seja, elas são amostras mais sensíveis ao estresse oxidativo, sendo a amostra 32 a mais sensível dentre todas. Por outro lado, as amostras que exibiam uma constante dos halos menores que o da referência são linhagens mais resistentes ao estresse oxidativo, como é o caso das amostras 06, 08, 09, 10, 12, 16, 21, 26, 27, 31, 38, 48, 50 e 51, sendo a amostra 10, a mais resistente dentre todas.

Gráfico 8 - Comparação da média dos halos das amostras clínicas com significância estatística ($p < 0,05$) em relação à amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606

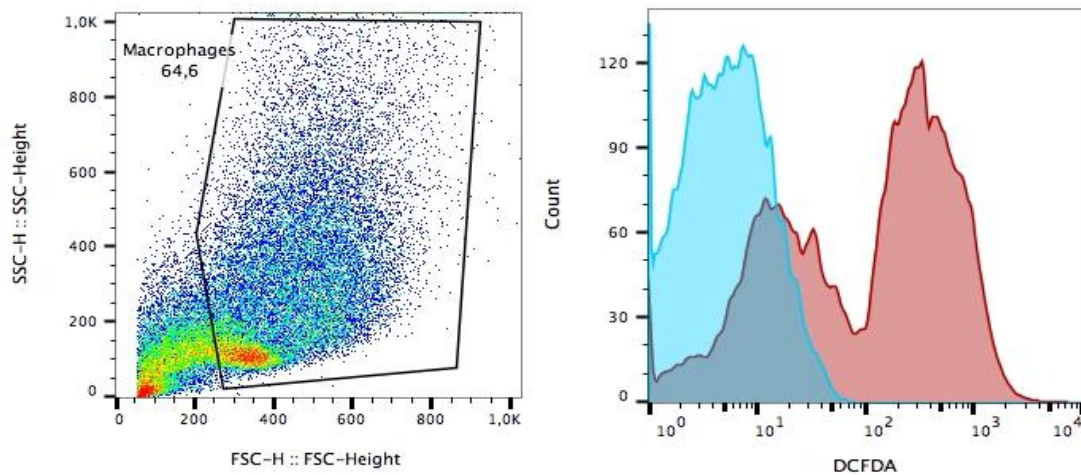
$P < 0.05$



6.3.5 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo

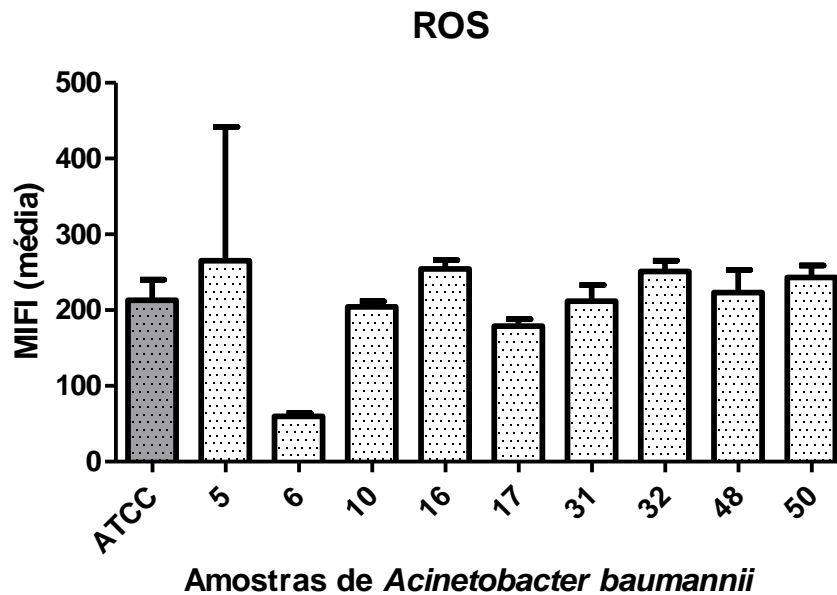
Este ensaio avaliou a produção de ROS pelos macrófagos com a incubação com diferentes amostras de *A. baumannii*. A figura 7 apresenta a análise da produção de ROS por citometria de fluxo. Em (A) temos o *Dotplot* representativo da população de macrófagos. Em (B) temos um histograma representativo do ensaio de produção de ROS, mostrando a população positiva, em vermelho, em comparação com o controle negativo em azul.

Figura 7 - Análise da produção de ROS por citometria de fluxo



O gráfico 9 representa a taxa de produção de ROS pelos macrófagos durante a incubação com as diferentes amostras de *A. baumannii*. Exceto a amostra 06, todas induziram a produção de ROS pelos macrófagos, em diferentes taxas. Contudo essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$).

Gráfico 9 - Taxa de produção de ROS pelos macrófagos



6.3.6 Avaliação da atividade hemolítica

No presente estudo, nenhuma das linhagens de *A. baumannii* demonstrou capacidade hemolítica aos eritrócitos de nenhum dos 06 tipos de sangue avaliados (FIGURA 8).

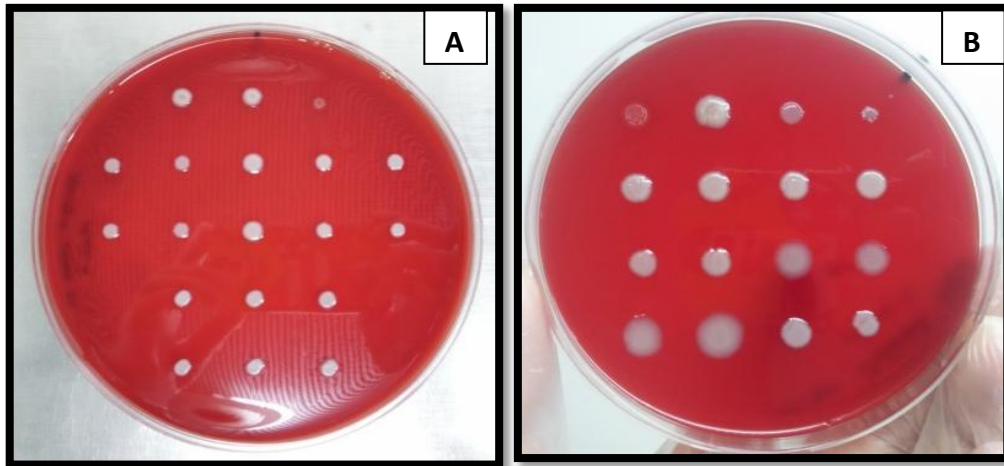
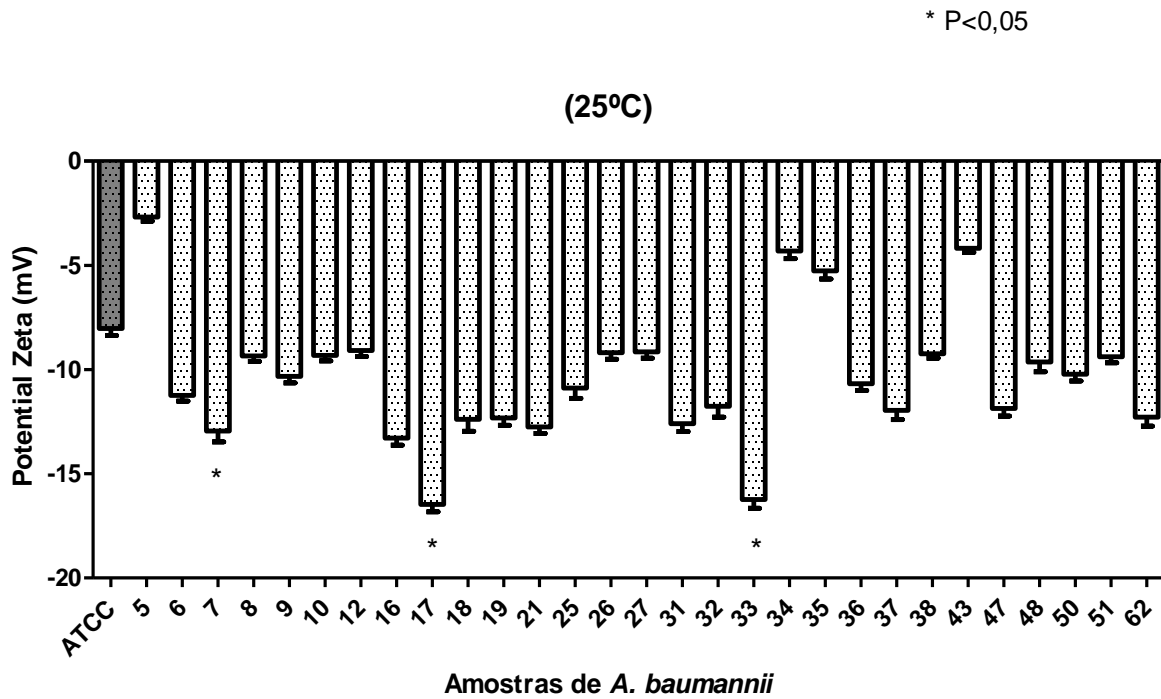


Figura 8 - Teste hemólise em placas de ágar- sangue. (A) Ágar-sangue de carneiro. (B) Ágar-sangue humano tipo AB positivo

6.3.7 Potencial Zeta

O resultado do potencial zeta, que avalia a eletronegatividade da superfície celular, para as 30 linhagens selecionadas está indicado no gráfico 10. Observou-se que a eletronegatividade celular variou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*A. baumannii* ATCC 19606) somente para as amostras 07, 17 e 33, apresentando um valor de potencial zeta bem menor (mais eletronegativo). A amostra 17 é a que possui menor potencial zeta dentre todas as linhagens avaliadas.

Gráfico 10 - Potencial Zeta de membrana das linhagens de *A. baumannii* representando algumas amostras com significância estatística ($p < 0,05$)



7 DISCUSSÃO

Embora seja comumente afirmado que espécies do gênero *Acinetobacter* causam doenças infecciosas principalmente em pacientes imunocomprometidos, a presença de fatores predisponentes como a colonização da pele, a pressão seletiva por exposição aos antimicrobianos de amplo espectro e a ruptura das barreiras anatômicas são relevantes para o estabelecimento desses processos. Os doentes com supressão de leucócitos constituem a minoria dos infectados com *A. baumannii*. Infecções causadas por *Acinetobacter* spp. emergiram paralelamente ao aumento da utilização de cuidados intensivos complexos. *Acinetobacter* foi inicialmente considerado um oportunista comensal - um patógeno de baixa patogenicidade, com significância mínima. No entanto, nas décadas subsequentes, o crescente uso da ventilação mecânica, cateterização venosa central e urinária, e a terapia antibacteriana têm causado um aumento na frequência e gravidade das infecções causadas por *Acinetobacter* spp. transmitidas constantemente aos doentes através da sua persistência à superfícies e a colonização transitória das mãos dos profissionais de saúde (WONG et al. 2017).

Estudo de Rocha et al. (2012) avaliando os preditores de um desfecho desfavorável em pacientes com infecções por *A. baumannii* em um hospital universitário em Uberlândia, MG, além de também avaliar os fatores relativos à sobrevida destes pacientes. No período entre 2009-2010, dos 84 isolados, 50 (59%) eram MDR, nove (11%) eram pan-resistentes e 25 (30%) não-MDR. Os fatores significativamente associados à resistência a multidrogas incluíram cirurgias prévias, presença de comorbidade (doença renal), uso de mais de dois dispositivos, nutrição parenteral e terapia antimicrobiana inadequada. Os fatores associados à mortalidade em pacientes com *A. baumannii* MDR neste estudo foram: idade > 60 anos, pneumonia, diabetes mellitus, doença renal, uso de mais de dois procedimentos invasivos e terapia antimicrobiana inadequada. A taxa de mortalidade foi de 39,7%. Dessa forma, nota-se que a vigilância exerce importância peculiar para evitar surtos deste patógeno oportunista e mortal.

Nosso estudo corrobora com estes dados. A média de idade dos pacientes foi de 60,6 anos, sendo a média do tempo de internação bem elevada, 61,5 dias. Além disso, as comorbidades que mais estiveram presentes foram insuficiência cardíaca

congestiva, imunossupressão, diabetes mellitus e insuficiência renal crônica. Noventa e cinco por cento dos pacientes fizeram uso de dispositivos invasivos, e 75% foram submetidos à ventilação mecânica. Ademais, todos os pacientes fizeram uso de algum tipo de antimicrobiano durante a internação durante um período prolongado (média de 31,6 dias), e a taxa de mortalidade foi de 25%.

Diante do quadro frequente de multirresistência a antimicrobianos em *A. baumannii*, as opções terapêuticas se tornam cada vez mais limitadas. Os beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e sulfonamidas não possuem atividade contra linhagens multirresistentes, o que leva a uma necessidade de utilização de antimicrobianos de amplo espectro e muitas vezes tóxicos. Os carbapenêmicos são a primeira linha de escolha em infecções severas, entretanto, as taxas de resistência a esta classe são crescentes e cada vez mais comuns. Devido à sua eficácia e espectro estendido, considera-se ampicilina-sulbactam ser a melhor escolha para linhagens resistente aos carbapenêmicos. Entretanto, a susceptibilidade ao sulbactam é incomum entre estas linhagens. A tigeciclina é um tratamento de segunda linha nesses casos, especialmente no tratamento empírico de pacientes com infecções graves. A polimixina, cujo uso é restrito devido às altas taxas de nefrotoxicidade associada, tem sido cada vez mais utilizada. Certamente o aumento do uso levou ao aumento das taxas de resistência também para estes antimicrobianos. As taxas de resistência à tigeciclina atingem 50% em algumas regiões, e polimixinas chegam a 20% na Grécia, assim como em outros locais. Dessa forma, isolados pan-resistentes são cada vez mais frequentes, o que evidencia a necessidade de terapia combinada, ou mesmo novas alternativas terapêuticas (WONG et al. 2017).

As amostras incluídas no nosso estudo foram todas resistentes ao meropenem, além de uma alta taxa de resistência a outros antimicrobianos: Ampicilina-Sulbactam (69%), Ceftazidime (55%), Gentamicina (41,3%) e Tigeciclina (51,7%), o que pode ser explicado pelo uso frequente de carbapenêmicos nos esquemas antimicrobianos adotados no Hospital avaliado (Anexo C).

Estudos prévios têm descrito a presença de colonização como um fator associado com o desenvolvimento de infecções por *A. baumannii* (PLEYFORD et al. 2007). Para avaliar o efeito da presença de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos em culturas de vigilância, no desenvolvimento subsequente de infecções clínicas por

este micro-organismo, Latibeaudiere et al. (2014) conduziram um estudo retrospectivo com todos os pacientes em uma UTI de um hospital na Flórida, EUA, entre 2011-2012. Nesse estudo foi observado que os pacientes com culturas de vigilância positiva apresentaram 8,4 vezes ($p < 0,0001$) maior risco de desenvolver uma infecção posterior de *A. baumannii* em comparação com os pacientes que permaneceram negativos nas culturas de vigilância.

Apesar de *A. baumannii* muitas vezes ser um patógeno oportunista, causando doenças em pacientes debilitados, a investigação dos desfechos de pacientes com doenças infecciosas por *A. baumannii* MDR é geralmente dificultada por diversas razões. Assim, embora as taxas de falha terapêutica e as taxas de mortalidade sejam elevadas, é extremamente difícil definir que a mortalidade seja atribuível somente à doença infecciosa por esse micro-organismo. Algumas pessoas com *A. baumannii* MDR podem ser acometidas por comorbidades subjacentes, instalação de dispositivos invasivos, terapia antimicrobiana inadequada, imunossupressão, bem como uma variedade de outras doenças infecciosas causadas por outros agentes patogênicos, concomitantemente à exposição aos antimicrobianos, o que resulta em uma característica peculiar de infecção (POGUE et.al, 2013).

No que se refere à associação entre a presença de genes de patogenicidade nas amostras avaliadas e o desfecho clínico dos pacientes estudados, sete amostras (24%) apresentaram todos os genes de patogenicidade pesquisados (5, 21, 31, 34, 37, 43 e 47). Estas amostras foram recuperadas de 07 pacientes distintos, nos seguintes sítios: 05 e 47 (aspirado traqueal), 21 (hemocultura), 31 (urocultura), 34, 37 e 43 (ponta de cateter). Dentre essas, os pacientes em que foram recuperadas as amostras 34 e 47 foram a óbito. Os pacientes referentes às amostras 5, 43 e 47 apresentavam ICC; 31 e 47 IRC; 31 e 37 imunossupressão. Todos os pacientes fizeram uso de dispositivos invasivos e, exceto o paciente referente à amostra 43, todos foram submetidos à ventilação mecânica. A amostra 34, referente ao paciente que foi a óbito, apresentou resistência a ampicilina-sulbactam e gentamicina; a outra (47) foi resistente a ceftazidime e tigeciclina (Anexo C).

Por fim, a amostra 06, que no presente estudo se destacou pela sua patogenicidade em alguns experimentos (maior indução de morte e apoptose em macrófagos, maior resistência ao estresse oxidativo em relação à amostra de referência, não indução

da produção de ROS pelos macrófagos), foi recuperada de uma hemocultura. O paciente apresentava como comorbidade ICC e DPOC. Fez uso de dispositivos invasivos durante a internação, inclusive ventilação mecânica. Ele foi internado por septicemia, apresentou posteriormente pneumonia e foi a óbito por choque séptico. A amostra foi resistente a todos os antimicrobianos testados, exceto polimixina.

É sabido, que dentre as espécies do gênero, *A. baumannii* representa um dos maiores causadores de pneumonia nosocomial, bacteremia, meningite e infecções secundárias a feridas. Interessantemente os graus de patogenicidade variam entre as diferentes linhagens, embora a exata razão não seja conhecida. Múltiplos fatores de patogenicidade tem contribuído para o seu sucesso como agente infeccioso (ANTUNES et al. 2014).

No nosso estudo a pesquisa de marcadores de patogenicidade nas amostras clínicas de *A. baumannii* incluiu genes relacionados à produção de cápsula, biofilme, indutores de apoptose nas células do hospedeiro e *quorum sensing*.

O *quorum sensing* é um mecanismo bacteriano que monitora a comunidade bacteriana a fim de modular a expressão gênica em resposta às mudanças na densidade populacional. Nesse sentido, o acúmulo de autoindutores no meio em que elas estão inseridas, relacionada à densidade populacional, inicia com uma cascata na transdução de sinal e culmina na ampla alteração da expressão gênica populacional. Dessa forma, muitos processos sob essa regulação requerem a ação de numerosos processos como, a bioluminescência, a formação de biofilme, a resistência a antimicrobianos, a esporulação e a competência para a captação de DNA exógeno. A investigação de *quorum sensing* na regulação de alguns fatores de patogenicidade tem permitido uma melhoria na compreensão da patogenicidade bacteriana e na interação parasita hospedeiro, além de ser um alvo atraente para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Das 29 amostras avaliadas nesse estudo, 10% apresentavam somente o gene *luxI* e apenas 7% apresentaram somente o *luxR*; 72% foram positivas para ambos os genes; duas amostras (36 e 62) não apresentaram nenhum dos dois genes. Estudos demonstram que a presença de *quorum sensing* em *A. baumannii*, mediado essencialmente por autoindutores do tipo AHL, apresentam variações quanto ao

tamanho da cadeia de carbono e a presença ou não de substituições, o que pode ficar fora do limite de detecção do autoindutor utilizado em nosso estudo, levando a uma positividade de moléculas de *quorum sensing* nesta espécie subestimada (NIU et al. 2008; BHARGAVA et al. 2010). Ademais, outro estudo mostrou que apesar de nenhuma AHL estar associada especificamente a uma espécie, 63% das linhagens de *Acinetobacter* produz mais do que uma AHL; além de seis diferentes tipos de moléculas sinalizadoras (PRASHANTH et al. 2012).

Os biofilmes representam sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas, sendo normalmente encontrados em substratos sólidos, como equipamentos hospitalares, o que representa grande risco. A formação de biofilme é um importante fator de patogenicidade em diversas infecções nosocomiais relacionadas aos dispositivos médicos, sendo resultado da capacidade do organismo de resistir à desinfecção química e física aplicada. Esse fato tem sido uma característica chave na patogenicidade de *A. baumannii*, especialmente em relação às infecções de âmbito intravascular e pneumonia associada à ventilação mecânica (BADAVE; KULKARNI, 2015).

A proteína Bap é uma molécula presente na superfície celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e tem sido associada com a adesão em superfícies abióticas durante a formação de biofilme por *A. baumannii*. Um estudo de Loehfelm et al. (2008) sugeriu que essa proteína em *A. baumannii* parece estar envolvida na manutenção da arquitetura do biofilme maduro, uma vez que os mutantes para este gene geraram uma estrutura menos espessa e volumosa comparada aos da linhagem selvagem. Outro estudo de Brossard et al. (2012) confirma esses dados. Bap é necessário para a formação de biofilme maduro em dispositivos medicamente relevantes, incluindo polipropileno, poliestireno e titânio. Análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que essa proteína é necessária para a estrutura da torre tridimensional e formação de canais de água, além de uma melhor adesão em células epiteliais brônquicas humanas e em queratinócitos neonatais. Ademais, este estudo também demonstrou que a presença de Bap aumenta a hidrofobicidade da superfície celular bacteriana.

Em nosso estudo, observamos que todas as amostras avaliadas foram positivas para o gene *bap* em análise por PCR, o que mostra sua alta prevalência nesta espécie. Um resultado semelhante foi também encontrado por Goh et al. (2013), no qual 22 das 24 amostras de *A. baumannii* multirresistentes aos carbapenêmicos carregavam esse gene. Dessa forma, em conjunto com a persistência em superfícies abióticas e na adesão às células eucarióticas, a produção dessa proteína é um passo importante na colonização bacteriana, o que pode resultar no desenvolvimento de doença infecciosa no hospedeiro.

Além do LPS, a cápsula polissacarídica tem sido identificada em estudos recentes como um relevante fator de patogenicidade em *A. baumannii*. Mutantes para os genes *ptk* (*wzc*) e *epsA* foram deficientes para o crescimento dessas em líquido ascítico humano, quando comparados à linhagem selvagem. Além disso, linhagens deficientes em cápsula foram completamente eliminadas após 24h de infecção em um modelo de infecção de tecidos moles, enquanto que a linhagem parental persistiu com $>10^7$ bactérias/mL no fluido exudativo (RUSSO et al. 2010).

No presente estudo, 76% das amostras apresentaram o gene *wzc* (05, 06, 08, 09, 10, 12, 16, 17, 18, 21, 26, 27, 31, 34, 35, 37, 38, 43, 47, 48, 50, 51) e todas as amostras apresentam o gene *gaiU*. Segundo Hu et al. (2013) o gene *gaiU* é responsável pela síntese de uma UDP-glicose e faz parte do metabolismo central em *E. coli*. Ele é necessário para a entrada nas vias de pentose e gluconato nesse micro-organismo. Por outro lado, estudos anteriores mostraram que tais vias não estão presentes em *A. baumannii* e, portanto, esse gene parece ter função somente na síntese de polissacarídeos, no qual ela é o ponto inicial para a biossíntese de muitos açúcares.

Entretanto, um estudo de Geisinger e Isberg (2015) avaliou o impacto de mutantes para diversos genes do locus K no fenótipo da cápsula e sua relação com a resistência aos antimicrobianos. O mutante para o gene *gaiU* mostrou um fenótipo deficiente tanto nos exopolissacarídeos capsulares quanto nas glicofomas de LPS dependentes do locus K. Dessa forma, conclui-se que, apesar desse gene estar presente de forma conservada em todos os tipos de locus K descritos, sugere-se que ele possa estar envolvido em mais de uma função, não podendo, portanto, ser o único indicador do fenótipo positivo para cápsula. Um estudo de Less-Miller et al.

(2013) confirma essa hipótese. Esse gene tem um papel pré-definido na formação dos glicanos da membrana externa, e suas subunidades são individualmente utilizadas para a glicosilação-O, ou podem ser polimerizadas para a formação da cápsula polissacarídica.

Por outro lado, genes relacionados à exportação da cápsula, como o *wzc*, tem mostrado ser essencial para a expressão da cápsula na superfície celular em *A. baumannii*. Ele faz parte de um complexo multiprotéico que transporta a cápsula do periplasma para a superfície celular (RUSSO et al. 2010). Ademais, outros estudos revelam que em *E. coli* esse gene está relacionado somente com a exportação de polissacarídeos capsulares (WHITFIELD et al. 2006). Sendo assim, o fenótipo positivo para a cápsula pode-se dar pela presença de ambos os genes, *gaiU* e principalmente *wzc*.

Porinas são proteínas de membrana que agem como um poro no qual atravessam diversas moléculas, como nutrientes, toxinas e antimicrobianos. Alterações, modificações, ou a redução na expressão dessas porinas têm sido associadas com a resistência aos antimicrobianos. Ademais, além da resistência, as porinas têm um claro papel na patogenicidade dos micro-organismos. Em *A. baumannii*, estudos têm relatado, com frequência, que a presença de OmpA sugere diversas funções, as quais incluem adesão à células epiteliais, citotoxicidade e indução de morte em células do trato respiratório, formação de biofilme e resistência a antimicrobianos. Além disso, OmpA demonstrou degradar o DNA cromossômico pela atividade da DNase-*like*. Por fim, em recentes modelos de pneumonia por *A. baumannii*, mutantes para esse gene resultam em diminuição da inflamação pulmonar, bacteremia e mortalidade dos camundongos, sugerindo a função de patogenicidade de OmpA (CERQUEIRA; PELEG, 2011). A Omp33 é uma porina descrita mais recentemente, e também está envolvida na resistência aos carbapenêmicos, na indução de apoptose e na modulação da autofagia em células do hospedeiro. Em estudos mais recentes ela também foi associada com a formação de biofilme (RUMBO et al. 2014; SMANI et al. 2013).

Em nosso estudo, 14% das amostras avaliadas foram positivas somente para *omp33* e 31% para *ompA*, sendo que todas as amostras que abrigavam *ompA* também abrigavam *omp33*. Apesar de todas elas serem resistentes aos carbapenêmicos,

elas apresentam diferentes perfis de patogenicidade, o que pode estar associado às diferenças na expressão dessas porinas. Além disso, existem outras proteínas envolvidas na patogenicidade do micro-organismo no hospedeiro, como por ex. a CarO, que não foram investigadas em nosso estudo (SATO et al. 2016).

Dentre as sete amostras positivas para todos os genes de patogenicidade pesquisados, quatro amostras (05, 31, 37 e 48) se destacaram pela indução de morte celular de macrófagos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), e a amostra 05 também se destacou pela maior indução de produção de ROS pelos macrófagos, apesar da diferença não ser significativa.

No que se refere aos testes fenotípicos de patogenicidade, este estudo avaliou a resistência ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, indução de morte celular em macrófagos derivados da medula óssea, apoptose, fagocitose e produção de ROS pelas mesmas células.

Diversos patógenos têm desenvolvido estratégias específicas para suprimir a resposta de células não-fagocíticas a fim de evitar a resposta imune inata do hospedeiro. A habilidade de patógenos bacterianos promover a morte celular do hospedeiro parece ser importante para a sobrevivência da bactéria e escape das defesas do mesmo e está implicada no mecanismo de patogênese de uma variedade de doenças infecciosas (SMANI *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual *A. baumannii* desempenha sua patogênese ainda não está totalmente elucidado. Krzyminska et al., (2012) apresentaram evidências de que *A. baumannii* induz apoptose em células epiteliais em uma localização extracelular, através de adesão às células e contato às células mediado por citotoxicidade. Ademais, para algumas amostras analisadas por estes autores, o contato bacteriano com as células e invasão subsequente foram requeridos para a citotoxicidade induzida por *A. baumannii*, e a morte celular se deram por oncose. Tais resultados sugeriram que a ativação de diferentes vias de morte celular em células epiteliais pode constituir um importante mecanismo patogênico pelo qual este micro-organismo evade o sistema imune e causa doença.

Nesse estudo, o ensaio para avaliação de apoptose induzida por *A. baumannii* utilizando anexina A5 e IP confirmou esses dados. As 03 amostras avaliadas (de referência, 05 e 06) induziram apoptose em macrófagos em um curto período de

incubação (3 horas), porém com diferença não significativa, ou seja, a indução aconteceu independentemente da presença dos genes *ompA* e/ou *omp33*. Apesar de a literatura associar essas porinas como indutoras de apoptose, o número de amostras testadas em nosso estudo foi pequeno, sendo insuficiente para excluir tal associação.

No que se refere ao ensaio de patogenicidade em macrófagos, foram avaliadas 20 amostras, sendo uma de referência (ATCC 19606) e 19 amostras que apresentaram perfis de semelhança genética de mais de >50% nas análises de ERIC-PCR realizadas no estudo anterior de Rafaela (FRANÇA, R. O. 2015). Percebe-se que algumas linhagens de *A. baumannii* reduziram a contagem celular com diferença significativa (05, 06, 16, 31, 32, 37, 47 e 48). Em contrapartida, quando se compara a diminuição da densidade celular de macrófagos após a infecção com a amostra de referência, *A. baumannii* ATCC 19606 versus as amostras clínicas, houve significância estatística somente com as amostras 06 e 32 ($p < 0,05$). Diante destes dados, percebe-se que a indução de morte também ocorreu independentemente da presença de *ompA* e *omp33*, pois as amostras 06, 32 e 48 não possuíam esses genes. Somente as amostras de referência, 05, 31, 37 e 47 possuíam todos os genes de patogenicidade pesquisados.

No que se refere à importância clínica de ROS, sabe-se que o peróxido de hidrogênio é um poderoso agente bactericida utilizado com frequência na desinfecção de dispositivos médicos em unidades hospitalares, especialmente onde estão ocorrendo surtos por micro-organismos multirresistentes. Ademais, a produção de ROS tem um importante papel na contenção de infecções bacterianas pelo sistema imune, através da sua produção por diferentes fagócitos. Estudos prévios demonstram que camundongos deficientes em fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), enzimas que produzem ROS, são altamente mais susceptíveis a infecção por *A. baumannii* (QIU et al. 2009).

As linhagens de *A. baumannii* contêm diversos genes que codificam enzimas anti-ROS, resultando em diferentes perfis de sensibilidade ao estresse oxidativo. As diferentes catalases produzidas pelas linhagens dessa espécie podem atenuar a produção de ROS pelas células fagocíticas do sistema imune, como monócitos, neutrófilos e macrófagos (SUN et al. 2016).

Para avaliar a resistência ao estresse oxidativo das amostras, foi realizado o ensaio de disco difusão com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações. Foram testadas quatro concentrações nas amostras clínicas e a de referência. Em um contexto geral, as amostras 19, 32, 33, 35, 36 e 62 mostraram-se mais sensíveis ao estresse pelo peróxido de hidrogênio do que a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606 com significância ($p < 0,05$), sendo a amostra 32 a mais sensível dentre todas; as amostras 06, 08, 09, 10, 12, 16, 21, 26, 27, 31, 38, 48, 50 e 51 mostraram-se mais resistentes, sendo a amostra 10 a mais resistente dentre todas.

Por outro lado, para avaliar a produção de ROS pelos macrófagos induzidos pelas amostras de *A. baumannii* e se havia alguma diferença nessa indução, foi realizado um ensaio no FACS. Foram testadas dez amostras (ATCC, 05, 6, 10, 16, 17, 31, 32, 48 e 50), e, exceto a amostra 06, todas induziram a produção de ROS em diferentes taxas, porém a diferença não foi significativa ($p < 0,05$). A falta de detecção de ROS neste ensaio para a amostra 06 foi um fato bastante interessante. Nossa hipótese é que isso pode ter ocorrido devido à sua degradação através de enzimas antioxidantes bacterianas, ou mesmo não houve a produção de ROS pelos macrófagos. Essa primeira hipótese é menos provável devido ao nosso tempo curto de incubação (30min). Entretanto, um estudo de Mandell et al. (1975) mostrou que linhagens de *S. aureus* com maior atividade de catalase eram mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pelos neutrófilos do que as com menor atividade dessa enzima, o que foi correlacionado com uma maior patogenicidade. No nosso estudo, a amostra 06 foi significativamente mais resistente ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio, ou seja, ela expressa uma alta quantidade de catalases.

Já em relação à nossa segunda hipótese, caso não houve a produção de ROS, a resposta inflamatória pode não ter sido induzida de forma adequada, o que levaria a morte de uma grande quantidade de macrófagos. Em um dos nossos ensaios, essa amostra foi uma das poucas que levou a uma significativa diminuição no número de macrófagos, quando comparada à amostra de referência. Sendo assim, esses dados mostram que isso pode ser mesmo devido à sua maior patogenicidade. Contudo, sabe-se que o LPS presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas é um forte indutor da resposta imune inata, com consequente produção de ROS pelos fagócitos. Dessa forma, apesar deste experimento ter sido realizado duas vezes, para a completa elucidação desse fato seriam necessários outros estudos,

especialmente relativos à expressão de LPS por essa amostra, o que não foi objetivo do nosso estudo.

Sun et al. (2016), provou que diferenças na produção e expressão de enzimas anti-ROS, como os diferentes tipos de catalases em *Acinetobacter* spp., resultam em diferentes fenótipos de patogenicidade. Em contrapartida ao nosso estudo, essa pesquisa revelou que embora a deleção de um dos genes produtores de catalases comprometa a sua habilidade em resistir a ROS, esses mutantes exibiram uma maior patogenicidade em um modelo *in vivo* do que a linhagem selvagem, provavelmente devido à sua indução atenuada de explosão respiratória pelos macrófagos. Além disso, essas amostras mutantes induziram uma menor produção de ROS pelos neutrófilos. Em nosso estudo, além de não ter sido investigado os diferentes genes de catalases expressos, não foi realizado experimentos *in vivo*, o que torna ainda mais difícil o esclarecimento do fenômeno.

Em relação ao ensaio de fagocitose na citometria de fluxo, todas as dez amostras de *A. baumannii* avaliadas foram fagocitadas em diferentes taxas, porém com diferença não significativa ($p > 0,05$). Apesar disso, exceto a amostra 32, todas elas carregavam os dois genes relativos à cápsula investigados, além de apresentarem valores de potencial zeta parecidos com os da amostra de referência. Dessa forma, percebe-se que, apesar da taxa de fagocitose ser diretamente influenciada pela presença de cápsula no micro-organismo, existem outros fatores envolvidos neste processo, além de que não foi foco do nosso estudo avaliar se estas amostras estavam expressando estes genes.

Por fim, conclui-se que outros estudos com n maior devem ser realizados, a fim de que essa diferença entre as taxas apareçam mais claras.

No que se refere à atividade hemolítica, foram testados seis diferentes tipos sanguíneos: de cavalo, carneiro e os quatro tipos sanguíneos humanos fator Rh positivo. Nenhuma das 29 amostras clínicas avaliadas apresentou atividade hemolítica em nenhum dos tipos sanguíneos testados. Em um estudo de Tayabali et al. 2012, avaliou-se a atividade hemolítica de sete diferentes espécies de *Acinetobacter*, e, somente a espécie *A. haemolyticus* apresentou beta-hemólise em ágar sangue de carneiro. Antunes et al. (2011) avaliou a atividade hemolítica de amostras de *A. baumannii* multirresistentes a antimicrobianos e, foi demonstrado que

é significativa a inter-variação na capacidade hemolítica entre as linhagens avaliadas, que dependeram basicamente do tipo sanguíneo utilizado e até mesmo do meio de cultura. Foram testados ágar-sangue de carneiro e de cavalo, e somente neste último todas as amostras mostraram algum tipo de hemólise. Ademais, percebeu-se que a atividade hemolítica foi maior em meio líquido do que no sólido. Este interessante resultado poderia explicar o porquê dessa espécie ser classificada até hoje como não-hemolítica.

O potencial zeta é uma medida da carga superficial celular e está envolvida com diversos papéis na célula. A fisiologia superficial é particularmente importante para organismos unicelulares no que se refere à manutenção do funcionamento celular. As superfícies celulares bacterianas possuem uma carga eletrostática negativa líquida em virtude de macromoléculas do envelope celular externo que são expostas ao ambiente extracelular. O grau de eletronegatividade periférica influencia a polaridade global da superfície da célula e pode ser avaliada com base no potencial zeta que é mais frequentemente determinada pela estimativa da mobilidade electroforética de células num campo elétrico (WILSON et al. 2001). Um estudo recente mostrou que alterações no potencial zeta em *E. coli* e *S. aureus* estavam correlacionadas com o aumento da permeabilidade da membrana, e foi observado que isso pode levar à morte celular. Além disso, este estudo também demonstrou que o LPS presente nas bactérias Gram-negativas proporciona uma maior eletronegatividade para a carga superficial total nessas bactérias (HALDER et al. 2015).

Estudos prévios têm relacionado o potencial zeta com a resistência à colistina. Soon e colaboradores (2010) observaram que a exposição de linhagens de *A. baumannii* multirresistentes à polimixina resultou num aumento dependente da concentração no potencial zeta. As diferenças de potencial zeta entre os fenótipos de *A. baumannii* provavelmente refletem variações na composição da membrana externa, que afetam o componente eletrostático da atividade da colistina.

A relação entre carga superficial, patogenicidade e fagocitose não é totalmente esclarecida. Estudos têm mostrado diferentes resultados em diferentes micro-organismos. Um estudo de NOSANCHUK e CASADEVALL (1997) com *C. neoformans* avaliou a relação entre a carga superficial celular, a cápsula e a taxa de

fagocitose por macrófagos. As linhagens capsuladas tiveram significativa ($p < 0,05$) carga superficial (medida pelo potencial zeta) mais eletronegativa do que as linhagens não capsuladas, e esse fato afetou a taxa de fagocitose. Outros estudos com *S. typhimurium*, *E. coli*, e *Y. enterocolitica* também demonstraram diferenças entre a taxa de fagocitose e a carga da superfície celular. Por outro lado, estudos com *Streptococcus* do grupo B, *Edwardsiella* spp. e micobactérias não tiveram uma consistente relação entre estes parâmetros.

No presente estudo, apenas as amostras 07, 17 e 33 apresentaram carga superficial significativamente ($p < 0,05$) mais eletronegativa do que a amostra de referência. Interessantemente apenas a amostra 17 possui o gene *wzc*, relativo à exportação da cápsula, e que confirma seu fenótipo positivo. O ensaio de fagocitose em citometria de fluxo foi realizado apenas com a amostra 17, e não houve uma diferença significativa na taxa de fagocitose por macrófagos entre ela e a amostra de referência. Para elucidar melhor esse processo, mais estudos devem ser realizados, especialmente relativos à expressão dos genes associados à cápsula e com um número maior de amostras.

8 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- Dentre as amostras avaliadas nesse estudo, todas foram positivas para o gene *bap* e *gaiU*, 13 foram positivas para o gene *omp33* e 9 para *ompA*; 25 para o gene *luxI*, 23 para o gene *luxR*, 22 para o gene *wzc*.
- Todos os genes relativos à patogenicidade pesquisados estiveram presentes em sete amostras.
- Todas as amostras foram fagocitadas em diferentes taxas e, apesar de essa diferença ser marcante em relação à amostra de referência para algumas amostras, ela não foi significativa ($P < 0,05$).
- Somente houve uma redução na densidade celular de macrófagos, significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, após a incubação com oito amostras bacterianas. Em relação à amostra de referência, somente as amostras 06 e 32.
- Houve indução de apoptose em macrófagos com três amostras avaliadas, e isso correu em um curto período de tempo (3 horas), e independente da presença dos genes *ompA* e *omp33*.
- Todas as amostras avaliadas foram fagocitados pelos macrófagos, em diferentes taxas.
- Seis amostras possuem média dos halos significativamente ($p < 0,05$) maiores que o da referência, ou seja, elas são amostras mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio, sendo a amostra 32 a mais sensível dentre todas. Por outro lado, quatorze amostras exibiu uma constante dos halos menor que o da referência, são linhagens mais resistentes, sendo a amostra 10, a mais resistente dentre todas.
- Exceto a amostra 06, todas induziram a liberação de ROS pelos macrófagos.
- Nenhuma das amostras avaliadas apresentou atividade hemolítica em nenhum dos 06 tipos sanguíneos testados.
- O potencial zeta foi significativamente ($p < 0,05$) mais eletronegativo em relação à amostra de referência somente para três amostras.

- As amostras de *A. baumannii* caracterizadas nesse estudo foram provenientes de 20 pacientes distintos. Do total, 50% são do sexo feminino e 50% do sexo masculino, com média de idade de 60,6 anos. A média da duração da internação foi de 61,5 dias. Todos os pacientes possuíam algum tipo de comorbidade durante a internação, sendo Insuficiência cardíaca congestiva (35%) e imunossupressão (30%) as mais prevalentes.
- Oitenta por cento dos pacientes estiveram sob cuidados intensivos (CTI/UTI), com média de duração de 17 dias. Em algum momento da internação, 95% fizeram uso de dispositivos invasivos, sendo que 75% foram submetidos à ventilação mecânica
- Todos os pacientes fizeram uso de algum antimicrobiano durante a internação, com média de duração de 31,6 dias. Ademais, cem por cento deles também apresentaram sepse em algum momento da internação, sendo que destes, 65% tiveram a confirmação do *A. baumannii* como agente etiológico, e 7 (35%) tiveram este micro-organismo como suspeito da sepse como causa etiológica.
- Em relação ao desfecho clínico dos 20 pacientes do estudo, 05 (25%) foram a óbito, sendo que em 03 deles o choque séptico foi a causa.

Os resultados desse estudo fornecem dados importantes que corroboram para a elucidação das infecções relacionadas a esse micro-organismo. Além de esclarecer sobre alguns fatores que predispõem os indivíduos mais acometidos. Em contrapartida, não foi possível fazer uma correlação entre as amostras que foram mais virulentas com as que apresentaram mais fatores de patogenicidade, uma vez que as amostras demonstraram diferentes perfis nos diversos experimentos. Além disso, os pacientes possuíam diferentes comorbidades e, portanto, gravidade clínica específica, tornando inviável a correlação entre desfecho clínico e patogenicidade da amostra.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO:

- As maiores limitações nesse presente estudo foram o tempo e a falta de recursos financeiros. O primeiro fato nos limitou quanto à realização de todos os ensaios realizados para todas as amostras propostas; quanto à expressão de genes de patogenicidade e principalmente quanto à exploração da relação bactéria/macrófagos;
- Outro fator limitante foi o tempo, visto que este é um trabalho de Mestrado. Os experimentos realizados referentes à patologia e interação bactéria/ macrófago além de custosos demandam muito tempo.

PERSPECTIVAS:

- Espera-se melhor explorar os mecanismos pelos quais as bactérias induzem apoptose;
- Investigar quais os receptores nos macrófagos envolvidos na internalização das bactérias;
- Ensaio "in vivo" com infecção experimental em camundongos imunossuprimidos ou não;
- Análises da expressão dos genes pesquisados, especialmente os relativos à cápsula;
- Pesquisa de genes associados à resistência ao estresse oxidativo;
- Avaliar o estudo proteômico de vesículas de membrana externa, a fim de melhor elucidar a patogenicidade desse micro-organismo;
- Investigar as proteínas expressas nas OMV's por esse micro-organismo em condições de estresse

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, I. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.11, n.4, p. 395-409, Abr. 2013.

AL-ANAZI, K.; AL-JASSER, A. M. Infections caused by *Acinetobacter baumannii* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. **Front Oncol**. v.4, n.186, Jul. 2014.

ALMEIDA, N. R. et al. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidades de Terapia Intensiva – **Revisão Integrativa**. Cadernos ESP, Ceará, v.9, n.1, p. 42-51, jan/jun. 2015.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.289, n. 1036, p. 321-31, 1980.

ANDRADE, S. S. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2003–2008). **Braz J Infect Dis**, v.12, p. 3–9, 2008.

ANTUNES, L. C. S. Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. **PloS One**. v.6, n.8, 2011.

ANTUNES, L. C. S. et al. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis**, v.71, n.3, p. 292-301, 2014.

ANVISA. Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. v.1, 2013. Disponível em:<<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/livros/Livro2-CriteriosDiagnosticosIRASaude.pdf>> Acesso: 20 Jan. 2017.

ASHIDA, H. et al. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. **J. Cell Biol**. v.195, n.6, p. 931–42, 2011.

BADAVE, G. K; KULKARNI, D. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. **J Clin Diagn Res**. v.9, n.1, 2015.

BECEIRO, A. et al. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clin Microbiol Rev.** v.26, n.2, p. 185–230, Abr. 2013.

BHARGAVA, N. et al. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cells population in *Acinetobacter baumannii*. **Infect Immun.** v.82, n.8, p. 3417-25, 2014.

BHARGAVA, N. et al. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. **Crit Rev Microbiol.** v.36, n.4, p. 349-60, 2010.

BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.48, n.1, p.1-12, Jan. 2009

BRAZIER, S. P. et al. Functional Interactions between BKCa α -subunit and Annexin A5: implications in apoptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

BRITIAN, M. et al. Identification of virulence markers in clinically relevant strains of *Acinetobacter* genospecies. **Int Microbiol.** v.15, n.2, p. 79-88, 2012.

BROSSARD, K. A.; CAMPAGNARI, A. A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infect Immun.** v.80, n.1, p. 228-33, 2012.

CERQUEIRA, G. M.; PELEG, A. Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. **IUBMB Life.** v.63, n.12, p. 1055–60, Dez. 2011.

CHOI, C. H. et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cell Microbiol**, v.7, n.8, p. 1127–1138, 2005.

CIOFU, O. et al. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother**, v.45, n.1, p. 9-13, 2000.

CLEMMER, L. M. et al. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology.** v.157, p. 2534–2544, 2011.

COYNE, S. et al. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.3, p. 947-53, 2011.

CROWLEY, L. C. et al. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harb Protoc**. 2016.

DEXTER, C. et al. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v.13, n.5, p. 567–573, 2015.

DJAHMI, N. et al. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. **BioMed Res Intern**. 2014.

EIJKELKAMP, B. A., et al. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Genomics**, v.15, p. 1-12, Nov 2014.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>> Acesso em: 20 Dez. 2016.

EVANGELISTA, S. S. Analysis of microbial load on surgical instruments after clinical use and following manual and automated cleaning. **Am J Infect Control**. v.43, n.5, p. 522-7, 2015.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. OXA beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.** v.27, n.2, p. 241–263, 2014.

FITZPATRICK, M. A. et al. Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. **J Infect**, v.70, n.2, p. 144-152, Fev. 2015.

FRANÇA, R. O. Fatores de virulência e resistência de amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*: caracterização fenotípica e genotípica e análise da interferência destes fatores na evolução e resolução dos processos. 9 Mar. 2015. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

FURTADO, G. H. et al. Correlation between rates of carbapenem consumption and the prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care

hospital in Brazil: a 4-year study. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.31, n.6, p. 664-6, Jun. 2010.

GADDY, G. A. et al. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infect immun**, v.77, n.8, p. 3150–3160, Ago. 2009b.

GADDY, J. A.; ACTIS, L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, v.4, n 3, p. 273-8, Abr. 2009a.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.73., n.4, p. 354-60, Ago. 2012.

GALLEGO, L. *Acinetobacter baumannii*: Factors Involved in its High Adaptability to Adverse Environmental Conditions. **J Microbiol Exp**, v.3, n.2, 2016.

GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ**. v.16, n.8, p.1093–1107, Abr. 2009.

GANDHAM, P. A review on multidrug - resistant *Acinetobacter baumannii*. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, n. 2, p. 9-13, 2014.

GEINSINGER, E.; ISBERG, R. R. Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Pathog**, v.11, n. 2, 2015.

GENTELUCI, G. L. et al. Emergência de *Acinetobacter baumannii* resistente a polimixina B em hospitais do Rio de Janeiro. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. v.52, n.2, Rio de Janeiro, Mar./Apr. 2016.

GOEL, V. K.; KAPIL, A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. **BMC Microbiol**, v.1, p.16–24, 2001.

GOH, H. M. S. et al. Molecular Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. **Appl Environ Microbiol**. v.79, n.21, p. 6535-43, Nov. 2013.

GOMES, A. C. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em unidade de terapia intensiva. **Rev enferm UFPE on-line**. Recife, v.8, n.6, p. 1577-85, Jun. 2014.

GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Curr. Protoc. Immunol**, 2015.

GORDON, N. C.; WAREAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**. v.35, n.3, p. 219-26, 2010.

GUZEL, C. B. et al. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bacteremia patients. **BioMed Res Intern**, p. 1-5, 2014.

HALDER, S. et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **Springerplus**. v.4, Nov. 2015.

HALDER, S. et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **Springerplus**. V.4, 2015.

HEINDORF, M. et al. Impact of *Acinetobacter baumannii* Superoxide Dismutase on Motility, Virulence, Oxidative Stress Resistance and Susceptibility to Antibiotics. **PLoS One**. v.9, n.7, 2014.

HILTUNEN, T. et al. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, Jan. 2017.

HOMENTA, H. et al. The 38.8 kDa Pili Subunit Hemagglutinin Protein of *Acinetobacter baumannii* is an Adhesin Protein that can activate s-IgA Production. **Pharm and Biol Sci**, v.9, n.1, p. 26-33, Jan. 2014.

HOSSAIN, Z.; FAKRUDDIN, M. Mechanism of Host Cell Death in Response to Bacterial Infections. **J Clin Cell Immunol**, v.3, n.4, 2012.

HOZBOR, D. F. Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. **Expert Rev Vaccines** , Dez. 2016.

HU, D. Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme. **PLoS One**. v.8, n.7, 2013.

JACOBS, A. C. *Characterizing Acinetobacter baumannii virulence factors*. 2011. 170 p. Tese (Doutorado) - Curso de Pathology And Microbiology, University Of Nebraska Medical Center, Omaha, 2011.

JEAN, S. S. et al. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. **Future Microbiol**. v.10, n.3, p. 407–425, 2015.

JIN, J. S. et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. **PLoS One**, v.6, n.2, 2011.

JOSHI, S. G.; LITAKE, G. M. *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogenic threat to public health. **World Clinic Infect Dis**, v.3, n.3, p.25-36, 2013.

KENYON, J. J. et al. Structure of the K12 capsule containing 5,7-di-N-acetylacinetaminic acid from *Acinetobacter baumannii* isolate D36. **Glycobiology**, v. 25, n.8, p. 881–887, 2015b.

KENYON, J. J. et al. Structure of the K6 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* isolate RBH4. **Carbohydr Res**. v.409, p. 30-5, Mai. 2015a.

KENYON, J. J.; HALL, R. M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. **PLoS One**, v.8, n.4, 2013.

KIM, J. et al. Molecular mechanism involved in the response to hydrogen peroxide stress in *Acinetobacter oleivorans* DR1. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.99, n.24, p. 10611-26, 2014.

KRZYMINSKA, S.; FRACKOWIAK, H.; KAZNOWSKI, A. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. **Curr Microbiol**, v.65, n.3, p. 319-29, Set. 2012.

KULKARNI, M. H; JAGANNADHAM, M. V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. **Microbiology**, v.160, p. 2109-2121, Oct. 2014.

LATIBEAUDIÈRE, R. et al. Surveillance cultures growing carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* predict the development of clinical infections: a retrospective cohort study. **Clin Infect Dis**. v.60. n.3, 2015.

LEE, Y. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a *bla*_{OXA-51-Like} Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n.2, p. 1124 –27, Fev. 2012.

LE MOS, E. V. et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. **Clinic Microbiol Infect**, v.20, n.5, p. 16-423, 2014.

LEES-MILLER, R. G. et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. **Mol Microbiol**, v.89, n.5, p. 816-30, Jul. 2013.

LI, L. et al. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.71, n.5, p. 1223-1232, 2016.

LIAO, Y. T. et al. *Acinetobacter baumannii* extracellular OXA-58 is primarily and selectively released via outer membrane vesicles after Sec-dependent periplasmic translocation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.59, n.12, p. 7346–54, 2015.

LOEHFELM, T. W. Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. **J Bacteriol**. v.190, n.3, p. 1036-44, 2008.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, v.37, n.2, p. 119-27, Abr 2014.

LUO, L. M. et al. 2015. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. **BMC Microbiol**, v.15, 2015.

MAGILL, S. S. et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. **N Engl J Med**, v.370, p.1198-1208, Mar. 2014.

MAMPRIM, A. R. et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: uma realidade hospitalar. **REMAS - Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v.6, n.1, p. 1-12, jul 2016. Disponível em: <<http://faculdadedofuturo.edu.br/revista1/index.php/remas/article/view/23>>. Acesso em: 12 Dez. 2016.

MANDELL, G. L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *S. aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction. **J Clin Invest**. v. 55, n.3, p. 561–66, 1975.

MANOIR, J.M. Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. **Vet Immunol Immunopathol**. v.89, n.4. p. 175-86, 2002.

MARINO, G.; KROEMER, G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. **Cell Res**. v.23, p. 1247–48, 2013.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nation wide surveillance study. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1866-71, Mai. 2011.

MARTI, S. et al. Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors. **PLoS One**, v.6, n.10, 2011.

MARTINEZ, J. L. et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiol Ver**, v.33, n.2, p. 430-49, 2009.

MARTINS, H. S. I. et al. Resistance Markers and Genetic Diversity in *Acinetobacter baumannii* Strains Recovered from Nosocomial Bloodstream Infections. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.11, n,2, p. 1464-78, 2014.

MCCONNELL, M. J. et al. 2011. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. **Vaccine**, v.29, n.34, p. 5705– 10, 2011.

MOLTER, G. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit: a multi-level strategic management approach. **J Hosp Infect**, v.92, n.2, p. 194- 198, 2016.

MOON, D. C. et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. **J Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 155-60, Fev. 2012.

NEVES, F. A. C. *Características clínico-epidemiológicas e microbiológicas relacionadas a cepas de Acinetobacter baumannii resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da UFMG*. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

NI, W. et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, n.5, p. 3215-8, Abr. 2016.

NIU, C. et al. Isolation and Characterization of an Autoinducer Synthase from *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**. v.190, n.9, p. 3386-92, Mai. 2008.

NOMURA, S. et al. Changes of surface hydrophobicity and charge of *Staphylococcus aureus* treated with sub-MIC of antibiotics and their effects on the chemiluminescence response of phagocytic cells. **Chemotherapy**, v.41, n.2, p. 77-81, 1995.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVAL, A. Cellular Charge of *Cryptococcus neoformans*: Contributions from the Capsular Polysaccharide, Melanin, and Monoclonal Antibody Binding. **Infect immun**, v.65, n.5, p. 1836–41, Mai. 1997.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infect Immun**. v.65. n.5, Mai. 1997.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance — role of carbapenemases. **Folia histochem cytobiol**, v.54, n.2, p. 61–74, 2016.

OIKONOMOU, O. et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance,

molecular identification and epidemiological data. **BMC Infect Dis**, v.15, p. 559, Dez. 2015.

PADOVESE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v.48, n.6, p.995-1001, 2014.

PAGANO, M. et al. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Braz J Microbiol**. v.47, n.4, p. 785-92, Out/Dez. 2016.

PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Ann N Y Acad Sci**. v.1277, p. 91–104., 2013.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Rev Microbiol**, v.14, n.9, p. 576–88, 2016.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinic Microbiol Rev**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.

PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rev enferm UFPE on line**, Recife, v.8, n.6, p: 1577-85, Jun. 2016.

PILLONETTO, M. et al. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.12, p. 7592–94, 2014.

PLAYFORD, E. G. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. **J Hosp Infect**. v.65. n.3, 2007.

POGUE, J. M. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, surveillance and management. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.11, n.4, p. 383-93, Abr 15 2013.

PRASHANTH, K. et al. Antibiotic resistance, biofilms and quorum sensing in *Acinetobacter species*, In: Antibiotic resistant bacteria - A continuous challenge in the new millennium. p. 978-953, Abr. 2012.

QIU, H. et al. Role of nadph phagocyte oxidase in host defense against acute respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in mice. **Infect Immun.** v.77, n.3, p.1015-21, 2009.

RIBEIRO, P. C. S. et al. 2016. Phenotypic and molecular detection of the *bla_{KPC}* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infect Diseases**, v.16, 2016.

RIEGER, A. M. et al. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **JoVE**, n.50, p.1-4, 2011.

ROCHA, M. L. et al. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Braz J Infect Dis.** V.16. n.3, Mai. 2012.

ROIER, S. et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. **Nat Commun.** 2016.

RUMBO, C. et al. Contribution of Efflux Pumps, Porins, and β -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.11, p. 5247–5257, 2013.

RUMBO, C. et al. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.7, p. 3084–3090, 2011.

RUMBO, C. et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells. **Infect Immun**, v.82, n.11, p.4666-80, Nov. 2014.

RUSSO, T. A. et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. **Infect Immun**, v.78, n.9, p. 3993-4000, Set. 2010.

SANTOS, L. R. L. et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde em unidades de terapia intensiva adulto de hospitais universitários: revisão integrativa. **Rev. Aten. Saúde**, São Caetano do Sul, v.14, n.48, p. 66-71, Jul/set. 2016.

SANTOS, R. P. et al. Prevalência de Infecção Hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva - Um estudo retrospectivo. **Rev Enferm UFSM**, v.4, n.2, p.410-414, Abr/Jun. 2014.

SATO, Y. et al. Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. **J Med Microbiol**. Nov. 2016.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*. v.13, n.10, p. 605-19, 2015.

SILVA, G. J.; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**, v.4, n.3, 2016.

SILVA, K. C; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. v.48, n.2, Rio de Janeiro, Abr. 2012.

SILVA, M. C. S. et al. O conhecimento da equipe de enfermagem sobre o cuidado ao paciente com infecção causada por micro-organismo multirresistente. **Rev Enferm**, v.4, n.2, p.48-54, Abr. 2015.

SINGH, H. et al. *Acinetobacter baumannii*: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. **Clinic Diag Rese**, v. 7, n.11, p. 2602-2605, Nov 2013.

SINGH, S. B. et al. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**. Disponível online 10 Jan. 2017.

SMANI, Y. et al. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.3, p. 1806–1808, Mar 2014.

SMANI, Y. et al. B. *Acinetobacter baumannii*-induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. **Microb. Pathog**. v.50, p. 224–232, 2011b.

SMANI, Y. et al. Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Infect Dis**, v.203, n.8, p. 1110-9, Abr. 2011a.

SOHRABI, N. et al. Prevalence of OXA-Type beta-Lactamases among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northwest of Iran. **Microb Drug Resist**, v.18, p. 385-389, 2012.

SOON et al. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. **J Antimicrob Chemother**. v.66, n.1, p. 126-133, 2010.

SOON, R. L. et al. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. **J Antimicrob Chemother**. v.66, n.1, p. 126-133, 2011.

SOUZA, E. S. et al, 2015. MORTALIDADE E RISCOS ASSOCIADOS A INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis, v.24, n.1, p. 220-8, Jan-Mar. 2015.

STACY, D. M. et al. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N-Acyl homoserine lactones. **ACS Chem Biol**. v.7, n. 10, p. 1719-28, 2012.

SUBHADRA, B. et al. *Quorum sensing in Acinetobacter*: with special emphasis on antibiotic. **AIMS Microbiol**, v.2, n.1, p. 27-41, 2016.

SUN, D. et al. KatG and KatE confer *Acinetobacter* resistance to hydrogen peroxide but sensitize bacteria to killing by phagocytic respiratory burst. **Life Sci**. v.148, p. 31-40, 2016.

TAYABALI, A. F. et al. Comparison of the Virulence Potential of *Acinetobacter* Strains from Clinical and Environmental Sources. **PLoS One**. v.7, n.5, Mai. 2012.

TURTON et al. 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect.** v.13, n.8, p. 807-15, 2007.

VIANA, R. H. et al. Recovery of resistant bacteria from mattresses of patients under contact precautions. **Am J Infect Control.** v.44, n.4, p. 465-9, 2016.

VIEIRA, P. B. V.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Rev Bras Ciênc Saúde**, v.19, n.2, p. 151-6, 2015.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annu Rev Biochem.** v.75, p. 39–68, 2006.

WINTER, J. S. et al. Microbiologic isolates and risk factors associated with antimicrobial resistance in patients admitted to the intensive care unit in a tertiary care hospital. **Amer J Infect Control**, v.41, p. 846-848, 2013.

WONG, D. et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. **Clin Microbiol Rev.** v.30, n.1, p. 409-47, 2017.

ZHANG, R. et al. 2013. Annexin A5-Functionalized Nanoparticle for Multimodal Imaging of Cell Death. **Mol Imaging.** v.12, n.3, p. 182-190, Mai. 2013.

10 ANEXOS**Anexo A – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 01402312.6.0000.5149

**Interessado(a): Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Colonização e infecção por bacilos Gram negativos não-fermentadores (BGNNF): impacto na morbidade e na mortalidade analisadas durante a internação e após a alta hospitalar"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa denominada: colonização ou infecção por bacilos Gram negativos não-fermentadores (BGNNF): impacto na morbidade e na mortalidade analisadas durante a internação e após a alta hospitalar. O objetivo deste estudo é verificar quanto tempo bactérias resistentes a vários antimicrobianos permanecem na pele ou em mucosa, e se a presença dessas bactérias está associada à maior risco de complicações nas pessoas que as possuem e ao risco de morrer.

Estamos pedindo a sua participação neste estudo por meio de realização de exame para verificar a existência de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos e que são encontradas na pele e em mucosas como axilas, região anal e nariz. O exame a ser realizado (swab) não causa dor, não necessita perfurar a pele, apenas rolar sobre a pele da região axilar, perianal e mucosa do nariz.

Todo material utilizado para o exame é descartável e não oferece riscos.

Serão coletadas informações sobre o seu estado de saúde, informações de prontuários e exames realizados. Todos os dados obtidos serão utilizados exclusivamente com a finalidade de pesquisa.

Os dados que identifiquem o paciente serão mantidos em sigilo. Nenhum paciente deixará de receber os cuidados devidos por se recusar a participar desta pesquisa.

Os pesquisadores estarão disponíveis para quaisquer dúvidas ou resolução de problemas eventuais, nos telefones (31) 88713036 (Dr Guilherme Luiz Milanez) ou (31) 9831-0004 (Dr Vandack Nobre). Caso ainda persistam dúvidas ou o participante sentir-se lesado por algum motivo, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG pelo telefone 3409-4592 ou no endereço Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 - Campus Pampulha – Belo Horizonte- MG.

Termo de consentimento:

Eu _____ declaro que fui informado (a) a respeito da pesquisa “colonização ou infecção por bacilos Gram negativos não-fermentadores (BGNNF): impacto na morbidade e na mortalidade analisadas durante

a internação e após a alta hospitalar.” e estou ciente que os riscos decorrentes da realização do swabsão mínimos ou inexistentes e que as informações obtidas são sigilosas e serão somente utilizadas para fins desta pesquisa.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Paciente _____ ou _____ responsável:

Investigador que forneceu as informações ao paciente:

Anexo C - Perfil genotípico e fenotípico das 30 amostras de *A. baumannii* avaliadas neste estudo

AMOSTRA	GENE <i>OmpA</i>	GENE <i>Omp33</i>	GENE <i>luxI</i>	GENE <i>luxR</i>	GENE <i>bap</i>	GENE <i>wzc</i>	GENE <i>gaiU</i>	MIFI Fagocitose (média)	MIFI ROS (média)	Potencial zeta (média)	LOCAL DE ISOLAMENTO	AB	GM	CTZ	TGC	PO	MP
ATCC	1	1	1	1	1	1	1	3112	213	-8,027	-	-	-	-	-	-	-
5	1	1	1	1	1	1	1	3673	265.1	-2,675	ASPIRADO TRAQUEAL	I	R	S	S	S	R
6	2	2	1	1	1	1	1	1111.5	59.65	-11,24	HEMOCULTURA	R	R	R	I	S	R
7	2	2	1	1	1	2	1	-	-	-12,95	ASPIRADO TRAQUEAL	R	R	R	R	S	R
8	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-9,343	ASPIRADO TRAQUEAL	R	S	S	R	S	R
9	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-10,33	PONTA CATETER	R	S	S	R	S	R
10	2	2	1	1	1	1	1	952	204.5	-9,318	HEMOCULTURA	I	S	S	R	S	R
12	2	1	1	1	1	1	1			-9,085	HEMOCULTURA	I	S	S	I	S	R
16	1	1	2	1	1	1	1	3717	254.5	-13,28	ASPIRADO TRAQUEAL	R	S	R	I	S	R
17	2	1	1	1	1	1	1	3354	179	-16,47	ASPIRADO TRAQUEAL	R	R	R	R	S	R
18	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-12,38	HEMOCULTURA	R	R	R	R	S	R
19	2	2	1	2	1	2	1	-	-	-12,32	HEMOCULTURA	I	R	R	R	I	R
21	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-12,75	HEMOCULTURA	R	S	R	R	S	R
25	2	2	1	1	1	2	1	-	-	-10,89	FERIDA OPERATÓRIA	R	R	R	R	S	R
26	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-9,192	PONTA CATETER	R	R	R	R	S	R
27	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-9,146	PONTA CATETER	R	S	S	R	S	R
31	1	1	1	1	1	1	1	3854.5	212	-12,60	UROCULTURA	R	S	R	I	S	R
32	2	2	2	1	1	2	1	3308	251	-11,76	UROCULTURA	I	R	I	R	S	R
33	2	2	1	2	1	2	1	-	-	-16,23	PONTA CATETER	R	I	R	S	S	R
34	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-4,311	PONTA CATETER	R	R	S	I	S	R
35	1	1	1	2	1	1	1	-	-	-5,270	PONTA CATETER	I	R	R	S	S	R
36	2	1	2	2	1	2	1	-	-	-10,68	ASPIRADO TRAQUEAL	I	I	R	S	S	R
37	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-11,96	PONTA CATETER	R	S	R	S	S	R
38	2	2	1	2	1	1	1	-	-	-9,248	PONTA CATETER	R	S	S	R	S	R

Anexo C - (Continuação) Perfil genotípico e fenotípico das 30 amostras de *A. baumannii* avaliadas neste estudo

AMOSTRA	GENE <i>OmpA</i>	GENE <i>Omp33</i>	GENE <i>luxI</i>	GENE <i>luxR</i>	GENE <i>bap</i>	GENE <i>wzc</i>	GENE <i>gaiU</i>	MIFI Fagocitose (média)	MIFI ROS (média)	Potencial zeta (média)	LOCAL DE ISOLAMENTO	AB	GM	CTZ	TGC	PO	MP
43	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-4,178	PONTA CATETER	R	R	I	I	S	R
47	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-11,87	ASPIRADO TRAQUEAL	I	S	R	R	S	R
48	2	2	1	1	1	1	1	370	223	-9,633	ASPIRADO TRAQUEAL	R	S	S	S	S	R
50	2	2	1	1	1	1	1	1423.5	243	-10,22	PONTA CATETER	R	S	R	I	S	R
51	2	1	1	1	1	1	1	-	-	-9,388	ASPIRADO TRAQUEAL	R	S	S	R	S	R
62	2	2	2	2	1	2	1	-	-	-12,28	HEMOCULTURA	I	S	S	I	S	R

➤ **Legenda:**

- Presença ou ausência do gene (1- positivo / 2- negativo)

- Ampicilina-Sulbactam (AB); Gentamicina (GM); Ceftazidime (CTZ); Tigeciclina (TGC); Polimixina (PO); Meropenem (MP)

➤ **Observação:**

As amostras seguintes pertencem aos mesmos pacientes:

-17, 18 e 26;

-7, 8 e 48;

-9 e 10;

-12 e 62;

-25 e 32;

