

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Dissertação de Mestrado

Ana Carolina Santos Ricoy

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE BACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA
CLÍNICA, COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EM
MODELOS INVERTEBRADOS ALTERNATIVOS, *CAENORHABDITIS ELEGANS* E
*PRISTIONCHUS PACIFICUS***

Belo Horizonte

2020

Ana Carolina Santos Ricoy

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE BACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA, COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EM MODELOS INVERTEBRADOS ALTERNATIVOS, *CAENORHABDITIS ELEGANS* E *PRISTIONCHUS PACIFICUS*

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

Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves

Co-orientadora: Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Belo Horizonte

2020

043

Ricoy, Ana Carolina Santos.

Avaliação da patogenicidade de bactérias de relevância clínica, com fenótipo de resistência a antimicrobianos, em modelos invertebrados alternativos, *Caenorhabditis elegans* e *Pristionchus pacificus* [manuscrito] / Ana Carolina Santos Ricoy. – 2020.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves. Co-orientadora: Dra. Simone Gonçalves dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. *Caenorhabditis elegans*. I. Alves, Viviane de Souza. II. Santos, Simone Gonçalves dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

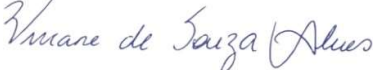
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Ana Carolina Santos Ricoy
Nº REGISTRO: 2018684307

Às 09 horas do dia 03 de Setembro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Vera Lúcia dos Santos, Samantha de Souza Ribeiro e a Profa. Viviane de Souza Alves – Orientador(a), para julgar o trabalho final "**Avaliação da patogenicidade de bactérias de relevância clínica, com fenótipo de resistência a antimicrobianos, em modelos invertebrados alternativos, *Caenorhabditis elegans* e *Pristionchus pacificus***", da aluna **Ana Carolina Santos Ricoy**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dra. Vera Lúcia dos Santos 

Dra. Samantha de Souza Ribeiro 

Profa. Dra Viviane de Souza Alves [Orientadora] 



Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

AGÊNCIA DE FOMENTO



AGRADECIMENTOS

É com muita alegria que concretizo mais uma etapa da minha vida, a realização de um sonho, a conclusão do meu mestrado não seria possível sem a colaboração de algumas pessoas, não poderia deixar de agradecê-las:

Primeiramente sou grata a Deus, o autor da minha vida, pela proteção, saúde, por ouvir as minhas orações e ser minha fonte de força e determinação em todos os momentos.

Agradeço a minha querida mãe Cláudia e família pelo incentivo, carinho e amor que foram essenciais nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu amado esposo Evaldo Junio e minha Princesa Heloísa, por todo carinho, apoio, amor e momentos especiais.

Agradeço à minha orientadora Dra. Viviane Alves, pela oportunidade e conhecimento que eu ainda estou adquirindo. Sou grata pelos momentos especiais e as novas amizades que eu fiz no LBCM (Ana Paula Rabelo, Aline Dias Valério, Roberta Viana, Camila Reis, Lucas Vieira, Jefferson Vinícius, Elisa Amorim, Mariana, Viviane Alves, Fábio Bondezan e Fátima).

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Simone, pela colaboração e orientação, que foram essenciais para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos, pelo apoio, risadas e brincadeiras que tornaram minha vida mais leve e feliz.

Ao meu professor de ciências, Adalberto Pastana, por ser um grande exemplo e inspiração, principal incentivador pelo meu amor pela Biologia nos tempos de escola e até hoje.

Agradeço à UFMG, em especial ao ICB, pela oportunidade de desenvolver meus estudos, e ao CNPq, que financiou esses dois anos de trabalho.

Por fim, sou grata a todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais um sonho.

“Faça as coisas o mais simples que você puder, porém não se restrinja às mais simples.”
(Albert Einstein)

RESUMO

As infecções hospitalares são um fator preocupante em todo mundo devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Os principais agentes causadores dessas infecções são patógenos bacterianos de grande relevância clínica conhecidos pela sigla “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.). Dentre esses, os Gram-negativos *Acinetobacter baumannii* MDR (Multidroga-resistente) e *Klebsiella pneumoniae* (KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), são os patógenos de maior prevalência no ambiente hospitalar, causando um grande número de infecções potencialmente fatais. Dessa forma, é imperativo realizar estudos relacionados aos aspectos da patogênese e a interação microrganismo-hospedeiro. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade destes microrganismos, com fenótipos de resistência a antimicrobianos, através da análise da sobrevivência dos modelos invertebrados, *Caenorhabditis elegans* e *Pristionchus pacificus*. O presente estudo mostrou que todas as amostras de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* foram patogênicas para os modelos *C. elegans* e *P. pacificus*. A amostra clínica de *A. baumannii* Ab05 foi mais patogênica em relação a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606 e às amostras clínicas Ab06, Ab17, Ab18, Ab21, Ab25 e Ab26 ($p < 0,05$), provocando a morte da população de *C. elegans* em 6 dias, com LT50 de 4 dias. As amostras clínicas de *K. pneumoniae* U4, U10, U14, V11 e P5 foram mais patogênicas do que a amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883, com taxa de sobrevivência, em 8 dias e LT50 igual a 4, 6, 5, 6 e 5 dias, respectivamente. A amostra U4 teve uma diferença significativa em relação a ATCC 13883, U10 e V11 ($p < 0,05$). Nos ensaios com *P. pacificus*, as amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25 foram mais patogênicas do que a amostra de referência de *A. baumannii* ATCC 19606, com morte de *P. pacificus* em 12 dias e LT50 de 10, 10 e 8 dias, respectivamente, porém não foi observada uma diferença significativa entre estas amostras clínicas em relação à amostra de referência. As amostras clínicas U14, V11 e P5 foram mais patogênicas do que a amostra de referência ATCC 13883 e amostras U4 e U10 ($p < 0,05$), com morte de *P. pacificus* em 10 dias e LT50 de 8, 8, 10 dias, respectivamente. Em suma, foram observadas diferenças na susceptibilidade e sobrevivência destes modelos a estes patógenos bacterianos com fenótipo de resistência a antimicrobianos.

Palavras chave: *Acinetobacter baumannii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Caenorhabditis elegans*, *Pristionchus pacificus*.

ABSTRACT

Hospital infections are a worrying factor worldwide due to the high rates of morbidity and mortality. The main causative agents of these substances are bacterial pathogens of great clinical production known by the acronym "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.). Among these, the Gram-negative *Acinetobacter baumannii* MDR (Multidrug-resistant) and *Klebsiella pneumoniae* (KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), are the most prevalent pathogens in the hospital environment, causing a great deal of fatalities. Thus, it is imperative to conduct studies related to aspects of pathogenesis and a microorganism-host interaction. In this context, this study aimed to evaluate the pathogenicity of these microorganisms, with antimicrobial resistance phenotypes, through the analysis of the analysis of invertebrate models, *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. The present study revealed that all of them like *A. baumannii* and *K. pneumoniae* were pathogenic for the models *C. elegans* and *P. pacificus*. The clinical sample of *A. baumannii* Ab05 was more pathogenic in relation to a reference sample *A. baumannii* ATCC 19606 and to the clinics Ab06, Ab17, Ab18, Ab21, Ab25 and Ab26 ($p < 0.05$), causing the population to die of *C. elegans* in 6 days, with LT50 of 4 days. The *K. pneumoniae* U4, U10, U14, V11 and P5 clinics were the most pathogenic than the reference sample *K. pneumoniae* ATCC 13883, with an urgency rate in 8 days and LT50 equal to 4, 6, 5, 6 and 5 days, respectively. The U4 sample had a significant difference in relation to ATCC 13883, U10 and V11 ($p < 0.05$). In trials with *P. pacificus*, clinics Ab06, Ab17 and Ab25 were more pathogenic than a reference sample of *A. baumannii* ATCC 19606, with the death of *P. pacificus* in 12 days and LT50 in 10, 10 and 8 days, respectively, however, no difference was observed. Clinics U14, V11 and P5 were more pathogenic than a reference sample ATCC 13883 and U4 and U10 ($p < 0.05$), with the death of *P. pacificus* in 10 days and LT50 in 8, 8, 10 days, respectively. In short, differences were observed in the susceptibility and survival of these models to these bacterial pathogens with antimicrobial resistance phenotype. In short, differences were observed in the susceptibility and survival of these models to these bacterial pathogens with antimicrobial resistance phenotype.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Caenorhabditis elegans*, *Pristionchus pacificus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As múltiplas contribuições de OmpA para a patogênese de <i>A. baumannii</i> ..	21
Figura 2. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	45
Figura 3. Experimento 1 - Infecção por <i>A. baumannii</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	57
Figura 4. Experimento 2 - Infecção por <i>A. baumannii</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	58
Figura 5. Experimento 1 - Infecção por <i>K. pneumoniae</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	61
Figura 6. Experimento 2 - Infecção por <i>K. pneumoniae</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	62
Figura 7. Experimento 1 - Infecção por <i>A. baumannii</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	65
Figura 8. Experimento 2 - Infecção por <i>A. baumannii</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	66
Figura 9. Experimento 1 - Infecção por <i>K. pneumoniae</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	68
Figura 10. Experimento 2 - Infecção por <i>K. pneumoniae</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre as amostras clínicas de <i>A. baumannii</i>	51
Tabela 2. Informações sobre as amostras clínicas de <i>K. pneumoniae</i>	51
Tabela 3. LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de <i>A. baumannii</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	56
Tabela 4. LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de <i>K. pneumoniae</i> em <i>C. elegans</i> (N2)	60
Tabela 5. LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de <i>A. baumannii</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	64
Tabela 6. LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de <i>K. pneumoniae</i> em <i>P. pacificus</i> (PS312)	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARDRA - Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças.

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético

ERC - *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos.

ESBL - Beta-lactamases de amplo espectro.

ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

FUdR - Floxuridina

GIM - German imipenemase

ICSAC - Infecção da Corrente Sanguínea Associada ao acesso Central

IDSA - Infectious Diseases Society of America

IMP - Imipenemase

INs - Infecções Nosocomiais

IRAS - Infecções Relacionadas aos Serviços de Saúde

ISC - Infecções dos Sítios Cirúrgicos

ITUAC - Infecções do Trato Urinário Associado ao uso de Cateteres

KPC - *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

LPS - Lipopolissacarídeos

MDR - Multidroga resistente

OmpA - Porina

OMS - Organização Mundial da Saúde

OMV's - Vesículas de Membrana Externa

PAV - Pneumonia Associada à Ventilação mecânica

rpoB - RNA polimerase subunidade β

SEC3 - Enterotoxina C3

SPM - São Paulo metalo- β -lactamase

TSA - Tryptic Soy Agar

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM - Verona imipenemase

hvKp - *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

cKp - *Klebsiella pneumoniae* clàssica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

I.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
I.1.1. Infecções bacterianas relacionadas à assistência a saúde	16
I.1.2. Gênero <i>Acinetobacter</i>	19
I.1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	20
I.1.3.1. Mecanismos de patogenicidade	24
I.1.3.1.1. Porinas	24
I.1.3.1.2. Cápsula	26
I.1.3.1.3. Vesículas de membrana externa (OMV's)	27
I.1.3.1.4. Formação de Biofilme	28
I.1.3.2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em <i>A. baumannii</i>	30
I.1.3.2.1. Produção de Beta-lactamases	30
I.1.3.2.2. Enzimas modificadoras de Aminoglicosídeos	33
I.1.3.2.3. Resistência a Polimixinas	34
I.1.3.2.4. Resistência a Tigeciclinas	34
I.1.4. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	35
I.1.5. Gênero <i>Klebsiella</i>	37
I.1.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
I.1.6.1. Mecanismos de patogenicidade.....	41
I.1.6.1.1. Cápsula	41
I.1.6.1.2. Lipopolissacarídeo (LPS)	42
I.1.6.1.3. Fímbrias	42
I.1.6.1.4. Sideróforos	43
I.1.6.2. Mecanismos de resistência aos Carbapenêmicos por <i>K. pneumoniae</i> . .	43
I.1.7. Uso de animais nas pesquisas científicas	46
I.1.8. <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
I.1.9. <i>Pristionchus pacificus</i>	51
II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	53
III.1. OBJETIVOS	55
III.1.1. Objetivo Geral	55
III.1.2. Objetivos específicos	55
IV.1 - MATERIAIS E MÉTODOS	56

IV.1.1. Cultivo e manutenção de microrganismos	56
IV.1.2. Padronização dos inóculos bacterianos	57
IV.1.3. Cultivo e manutenção dos modelos invertebrados alternativos	58
IV.1.4. Sincronização de <i>C. elegans</i> e <i>P. pacificus</i>	58
IV.1.5. Ensaio de sobrevivência	59
IV.1.6. Análises estatísticas	59
V.1 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
V.1.1. Avaliação da sobrevivência da população de <i>C. elegans</i> infectada por <i>A. baumannii</i>	60
V.1.2. Avaliação da sobrevivência da população de <i>C. elegans</i> infectada por <i>K. pneumoniae</i>	64
V.1.3. Avaliação da sobrevivência da população de <i>P. pacificus</i> infectada por <i>A. baumannii</i>	68
V.1.4. Avaliação da sobrevivência da população de <i>C. elegans</i> infectada por <i>K. pneumoniae</i>	71
VI - CONCLUSÕES	75
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. 1 - Infecções bacterianas relacionadas à assistência a saúde

Infecções nosocomiais ou infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), ocorrem em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, e representam um grande problema de saúde pública (KHAN *et al.*, 2017). Estima-se que a cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento podem adquirir uma das infecções associadas à assistência à saúde (NEJAD *et al.*, 2011; DANASEKARAN e ANNADURAI, 2014).

Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde - OMS (2011), aproximadamente 15% de todos os pacientes hospitalizados estão suscetíveis a infecções nosocomiais. Como resultado do aumento destas infecções, há uma maior permanência nos hospitais e incapacidade a longo prazo dos pacientes, aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, um encargo financeiro adicional para o sistema de saúde, altos custos com medicamentos para pacientes e suas famílias e muitas mortes (SYDNOR e PERL, 2011; KHAN *et al.*, 2017; AGABA *et al.*, 2017).

As IRAS podem ser rapidamente adquiridas com 48 a 72 horas após a admissão do paciente (VINCENT, 2003), e suas manifestações clínicas podem ser observadas durante a internação, em decorrência a procedimentos hospitalares, ou após a alta médica (BRASIL, 1998).

Os pacientes mais suscetíveis a essas infecções são aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), unidades de queimados, submetidos a transplante de órgãos e neonatos. As infecções e sepse são a principal causa de morte nas UTI's, com taxas de mortalidade que chegam a 60% e representam aproximadamente 40% do total de gastos nas UTIs (BOUCHER *et al.*, 2009; VINCENT *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2017). No Brasil, a prevalência de IRAS em UTI's é de 61,6%, representando cerca de 5 a 10 vezes maior do que em outras unidades hospitalares e a mortalidade dos pacientes acometidos nesse ambiente pode chegar a 40% (BORK *et al.*, 2015). Os tipos de infecções mais prevalentes e que correspondem mais de 60% de todas as infecções hospitalares pode-se citar: infecções dos sítios cirúrgicos (ISC), infecção da corrente sanguínea associada ao acesso central (ICSAC), infecções do trato

urinário associado ao uso de cateteres (ITUAC) e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (AGABA *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2017).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2017), as ISC's são infecções relacionadas a procedimentos cirúrgicos, com ou sem a colocação de implantes, em pacientes internados e ambulatoriais, e são indicadas com alta prevalência em relação às IRAS, sendo a segunda ou terceira infecção mundial que mais atinge pacientes submetidos a qualquer tipo de cirurgia. No Brasil, a ISC ocupa a terceira posição entre todas as infecções nos serviços de saúde, que corresponde a 14% a 16% das infecções encontradas em hospitalizados.

A incidência de ISC podem chegar a 20%, dependendo dos critérios de procedimento e vigilância utilizados, além de condições subjacentes, como por exemplo, HIV, imunossupressão, doenças vasculares pacientes que passaram por transplante, recém-nascido com baixo peso (OWENS e STOESSEL, 2008; AGABA *et al.*, 2017). Além de ser responsável por 6% de todas as admissões em UTIs, com taxa de mortalidade de 40% (PRONOVOST *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013; DAT *et al.*, 2017). No Brasil, a densidade da incidência de ICSAC em pacientes internados em UTI's neonatais apresenta variação entre zero a 31,4/ 1000 cateter venoso central/dia (ANVISA, 2015).

Em relação as infecções do trato urinário, são uma das causas mais prevalentes de IRAS que ocorrem globalmente, apresentando grande potencial preventivo, visto que a maioria está relacionada ao uso de cateter vesical, podendo manifestar após 48 horas de uso desse dispositivo. As ITUAC's podem desenvolver quando os pacientes permanecem com o dispositivo além do necessário, pois o tempo de permanência vesical é um fator crucial para a colonização e infecção por bactérias ou fungos (ANVISA, 2016, 2017; AGABA *et al.*, 2017).

De acordo com os Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC (2015), cerca de 12% a 16% dos pacientes adultos internados em hospitais terão um cateter vesical em algum momento durante a internação e, a cada dia que o cateter urinário permanece, o paciente tem um risco aumentado de 3% a 7% de adquirir uma infecção do trato urinário associada a este. Esse tipo de infecção em pacientes com cateter pode levar a complicações como prostatite, epididimite e orquite em homens e cistite, pielonefrite, bacteremia por bactérias Gram-negativa, endocardite, osteomielite vertebral, artrite séptica, endoftalmite e meningite (SCOTT, 2009).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é a infecção nosocomial encontrada em 9% a 27% dos pacientes em uso desses equipamentos e geralmente ocorre após 48 horas da intubação endotraqueal ou traqueostomia, apresentando sintomas como febre, secreção traqueobrônquica purulenta, infiltrado pulmonar, leucocitose e declínio na oxigenação

(KOENIG e TRUWIT, 2006; MOGYORÓDI *et al.*, 2016; AGABA *et al.*, 2017). Esta condição está associada ao aumento da permanência em UTI e no ambiente hospitalar, e apresenta um índice de mortalidade de 15% a 50 % (YOSHIMURA *et al.*, 2017).

Durante a hospitalização, o paciente está exposto a patógenos de diferentes fontes, como ambientais, provenientes dos profissionais da saúde ou de outros pacientes infectados, objetos contaminados e até mesmo visitantes. Os patógenos nosocomiais incluem, fungos, bactérias e vírus. Dentre esses, as bactérias são os microrganismos mais comumente responsáveis pelas IRAS e alguns dos agentes etiológicos são espécies pertencentes à microbiota residente do paciente, geralmente sem causar doença, porém em pacientes com doenças subjacentes ou defesas imunológicas comprometidas são particularmente vulneráveis (RICE, 2008; KHAN *et al.*, 2017).

O aumento da expectativa de vida nos últimos anos devido aos avanços na ciência e tecnologia permitiu o crescimento do número de pessoas com idade avançada e como consequência uma maior probabilidade de existência de doenças crônicas debilitantes e elevado número de condições de imunossupressão adquirida ou induzida (OLIVEIRA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2017). Esses fatores, somados com uso mais frequente de dispositivos médicos invasivos, uso e prescrições inadequadas de antimicrobianos em instituições de saúde e na comunidade aumentaram exponencialmente o risco de aquisição de IRAS por microrganismos resistentes a esses antimicrobianos (DIVO; MARTINEZ; MANNINO, 2014).

Entre os agentes causadores de IRAS, estão as bactérias Gram-positivo e as Gram-negativo resistentes a antimicrobianos, incluindo *Staphylococcus* spp., uma grande variedade de Enterobacteriaceae (principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*), espécies de *Pseudomonas* e espécies de *Acinetobacter*, que respondem por até 70% das infecções em pacientes de UTI (TRILLA, 1994; CHAMBERS, 2005).

Relatórios usando dados de estudos de vigilância hospitalar, bem com a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), começaram a se referir a esse grupo de patógenos nosocomiais como “patógenos ESKAPE” (SANTAJIT e INDRAWATTANA, 2016). ESKAPE é uma sigla para o grupo de bactérias, que abrange tanto espécies Gram-positivas e Gram-negativas, compostas por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., são as bactérias mais prevalentes e de extrema relevância clínica, não apenas porque causam a maior parte das infecções nosocomiais, mas também porque representam paradigmas de patogênese,

transmissão e mecanismos de resistência a medicamentos (RICE, 2008; BOUCHER *et al.*, 2009).

I.1.2. Gênero *Acinetobacter*

O microrganismo foi isolado pela primeira vez do solo usando meio mínimo enriquecido com acetato de cálcio pelo microbiologista holandês Beijerinck em 1911, que o nominou como *Micrococcus calcoaceticus* (BEIJERINCK, 1911). Em 1954, Brisou e Prevot agruparam as bactérias estudadas por Beijerinck e um gênero denominado *Achromobacter* (BRISOU e PREVOT, 1954). Posteriormente, Paul Baumann em 1968 propôs o gênero denominado de *Acinetobacter* (vindo do grego “akinetos”, que significa não-móvel) que foi aceito e utilizado para distinguir os organismos com base em sua motilidade (BAUMANN *et al.* 1968).

O gênero *Acinetobacter* está inserido no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem *Pseudomonadales*, família *Moraxellaceae* (EUZÉBY, 2020). É composto por bactérias Gram-negativo não móveis, aeróbias estritas, não fermentadoras (incapazes de fermentar carboidratos para obtenção de energia), não exigentes nutricionalmente, oxidase-negativas e catalase-positivas (VIEIRA e PICOLI, 2015). Em relação a sua morfologia, apresentam-se como bastonetes curtos e espessos, com diâmetro de 1,0 a 1,5µm e apresentando comprimento de 1,5 a 2,0µm na fase exponencial de crescimento, durante a fase estacionária tornam-se cocobacilares (ABBOTT *et al.*, 2013).

As espécies de *Acinetobacter* de origem humana podem ser cultivadas em meios de cultura sólidos comumente utilizados em laboratórios, como por exemplo, Ágar sangue de carneiro e *Tryptic Soy Agar* (TSA), onde multiplicam-se bem em temperatura de 37°C, porém a temperatura ótima é de 30 a 35°C. Em meio TSA elas formam colônias lisas, com coloração branca acinzentada ou amarelo-pálido, algumas vezes podem apresentar um aspecto mucóide e medem de 1,5 a 3 mm de diâmetro. Algumas espécies, como *A. haemolyticus*, apresentam atividade hemolítica (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; ZHENG *et al.*, 2013).

Atualmente, existem cerca de 60 espécies de *Acinetobacter* descritas, das quais a grande maioria é considerada não-patogênica e poucas espécies são patógenos humanos oportunistas (HARDING *et al.*, 2017; EUZÉBY, 2020). As espécies integrantes desse gênero são ubíquas na natureza, podendo ser encontradas em ambientes naturais como água e solo; ou até mesmo em materiais inanimados e colonizando seres humanos (ZHENG *et al.*, 2013).

Acinetobacter spp. conseguem utilizar vários compostos orgânicos como fonte de carbono. Ao realizar o teste de oxidase é possível a identificação presuntiva do gênero *Acinetobacter*, o que contribui para a diferenciação do grupo de outros microrganismos não fermentadores (JOSHI e LITAKE, 2013). Um método clássico e altamente confiável para a identificação em nível de gênero, é o sequenciamento do gene 16S rRNA, no entanto, esse método tem pouca capacidade discriminatória no nível das espécies (WANG *et al.*, 2014), pois *Acinetobacter* spp. apresentam grande similaridade fenotípica entre si, principalmente as espécies de relevância clínica, o que dificulta a identificação em nível de espécie (PELEG, SEIFERT e PATERSON, 2008; WANG *et al.*, 2014).

A identificação das espécies de *Acinetobacter* é feita através de métodos moleculares validados como, por exemplo, a hibridação DNA-DNA, Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), seqüenciamento do gene rpoB (RNA polimerase subunidade β) e suas regiões espaçadoras de flanqueamento. No entanto, esses métodos são demorados, muito trabalhosos e por isso não podem ser implementados rotineiramente nas práticas laboratoriais (BOUVET e GRIMONT, 1986; VANEECHOUTTE *et al.*, 1995; LA SCOLA *et al.*, 2006; PELEG, SEIFERT e PATERSON, 2008; HAMOUDA, 2017).

Acinetobacter spp. geralmente, são consideradas como integrantes da microbiota da pele, membranas mucosas ou faringe e secreções respiratórias humanas e são responsáveis por uma ampla variedade de infecções locais e sistêmicas, incluindo pneumonia, septicemia e infecções de feridas (ALMASAUDI, 2018).

Os membros clinicamente mais relevantes do gênero se agrupam filogeneticamente no complexo *Acinetobacter calcoaceticus – baumannii* (*Acb*)(TOUCHON *et al.*, 2014). O complexo *Acb* é composto por cinco espécies patogênicas: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijkschoorniae*; e *Acinetobacter calcoaceticus* (com predominância ambiental e limitada relevância clínica). Tais espécies, com exceção de *A. calcoaceticus*, estão presentes tanto em infecções hospitalares quanto adquiridas na comunidade (NEMEC *et al.*, 2011,2015; COSGAYA *et al.*, 2016; HARDING *et al.*, 2017).

I.1.3. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo que emergiu de um microrganismo de patogenicidade questionável para um agente infeccioso de grande relevância

clínica para hospitais em todo o mundo. Até o início dos anos 90, era vista como uma bactéria ambiental relacionada com algumas infecções oportunistas e com um baixo potencial patogênico. No entanto, *A. baumannii* ganhou importância como patógeno nosocomial, sendo responsável por cerca de 80% de todas as IRAS causadas pelas espécies do gênero *Acinetobacter* (LIN e LAN, 2014; HARDING *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2018; XIE *et al.*, 2018).

A. baumannii está envolvido em uma variedade de infecções oportunistas da pele, trato urinário, corrente sanguínea, meningites, endocardite e principalmente pneumonia associada à ventilação mecânica (PELEG *et al.*, 2008; ELIOPOULOS *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013). Os pacientes mais suscetíveis a essas infecções são aqueles gravemente enfermos que têm doença subjacente; foram hospitalizados por longos períodos e/ou estão sendo submetidos a procedimentos invasivos com o uso prévio de drogas antimicrobianas, submetidos à ventilação mecânica, e que se encontram em UTIs (FOURNIER *et al.*, 2006; PLAYFORD *et al.*, 2007; CASTILHO *et al.*, 2017).

Esse patógeno tem sido relatado como um microrganismo geograficamente dependente, apresentando uma maior relevância epidemiológica em países tropicais ou sub-tropicais, sendo que maioria das infecções ocorrem durante os meses mais quentes e úmidos (DEXTER *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS (2017), *A. baumannii* é considerado como um dos patógenos nosocomiais de prioridade 1 (Crítica), apresentando características como grande capacidade de disseminação em hospitais e colonização por longos períodos de tempo em superfícies bióticas e abióticas; é a principal causa de PAV e infecções da corrente sanguínea e de feridas, sendo responsável por uma alta mortalidade em infecções invasivas, causadas principalmente por linhagens resistentes ao carbapenem; além de ser intrinsecamente resistente a várias classes de antimicrobianos com uma alta capacidade em adquirir resistência.

As espécies de *Acinetobacter* são encontradas amplamente em objetos inanimados, dispositivos médicos e nas mãos de funcionários da UTI do que outros patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp.. Os dispositivos médicos reutilizáveis como tubos de ventilação, dispositivos de monitoramento de pressão arterial, umidificadores, lavatórios, mictórios de plástico e respirômetros são os equipamentos em que a espécie *A. baumannii* é isolada com maior frequência (LEE *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2014).

É difícil recuperar dispositivos médicos, uma vez que eles são frequentemente colonizados por *Acinetobacter* spp. em vez de infectados (LEE *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2014). Essa capacidade de colonizar dispositivos médicos, principalmente aqueles com materiais plásticos, como por exemplo, tubos endotraqueais, catéteres e diversos outros biomateriais, deve-se ao alto grau de hidrofobicidade da superfície celular que auxilia na adesão bacteriana e formação do biofilme em superfícies inanimadas e também pode ajudar a evitar a fagocitose pelo sistema complemento dos pacientes que se encontram conectados fisicamente a estes dispositivos (ESPINAL *et al.*, 2012).

A maioria das linhagens de *A. baumannii* podem persistir por mais tempo em superfícies secas do que *Escherichia coli*; algumas destas podem permanecer viáveis por mais de quatro meses. Além disso, *A. baumannii* foi capaz de sobreviver por mais de 20 dias em superfícies de vidro, quando colocada à temperatura ambiente, e persistiu em superfícies úmidas e secas (LEE *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2014). Em locais secos como colchões, travesseiros, chão, mesas, materiais de fórmica e prontuários e equipamento de radiografia, *A.baumannii* pode sobreviver em média 6 dias (ANTUNES, 2014).

A capacidade de sobreviver em superfícies secas sob condições limitantes de nutrientes pode estar relacionado a formação de biofilme que facilita a persistência e a transmissão de *A. baumannii* no ambiente natural e médico. Além disso, dispositivos e equipamentos médicos colonizados podem servir como reservatórios em surtos hospitalares prolongados (KANAFANI e KANJ, 2014).

Como muitas infecções por *A. baumannii* foram relatadas repetidamente entre veteranos e soldados que serviram no Iraque e no Afeganistão, o patógeno foi referido como "Iraqibacter". Os militares com ferimentos traumáticos devido aos conflitos apresentavam osteomielite, infecções respiratórias e bacteremia provocadas por *A. baumannii* (CDC, 2004). De fato, as infecções dos soldados por *Acinetobacter* não foram adquiridas do meio ambiente, mas durante sua admissão em instalações médicas durante os processos de estabilização, tratamento de emergência e evacuação por meio do sistema médico militar (LEE *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2014).

Acredita-se que o recente aumento na incidência de *A. baumannii*, está em grande parte associado as tropas de combate colonizadas por linhagens multidroga resistente (MDR) de *A. baumannii*, pois esses militares colonizados serviam como reservatório e conseqüentemente contribuía para a disseminação destas linhagens MDR (HOWARD *et al.*, 2012).

A evolução de linhagens MDR de *A. baumannii* é bem documentada e geralmente é caracterizada pelo aumento da resistência às cefalosporinas de primeira e segunda geração na década de 1970, seguidas por relatos de resistência ao imipenem nas décadas de 1980 e 1990. Desde então, vários surtos foram relatados na Ásia, Oriente Médio, Europa e América do Norte e do Sul (NASR, 2020).

As infecções por linhagens MDR de *A. baumannii* geralmente são definidas por resistência a três ou mais representantes das famílias de antibióticos quinolona, cefalosporina, betalactâmicos, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (HUIJER et al., 2006).

De acordo com CDC (2013), a maioria das linhagens clinicamente relevantes de *A. baumannii* é MDR, e são responsáveis por até 20% das infecções em UTI's e por 7% das infecções em pacientes fisicamente conectados a equipamentos médicos.

Um estudo mostrou que 47% das amostras de *A. baumannii* isoladas na América do Norte são MDR (LOB et al., 2016). Nos Estados Unidos da América, estima-se que aproximadamente 12.000 infecções por *A. baumannii* ocorram anualmente com 500 mortes associadas a essas infecções (HOFFMAN-ROBERTS, 2015).

Um relatório de vigilância do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças - ECDC em 2016 mostrou que 43,3% das amostras europeias de *A. baumannii* apresentaram resistência combinada a fluoronoquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos, enquanto 49% eram resistentes a carbapenêmicos (ECDC, 2017).

No Brasil, a resistência aos carbapenêmicos aumentou ao longo dos anos de 12,6% (1997-1999) para 71% (2008-2010), e essa taxa é comparável à observada em outros países da América do Sul, como por exemplo, o Chile e Argentina (GALES et al., 2012).

No estudo de Giammanco e colaboradores (2017), 18.741 amostras de *A. baumannii* foram coletados globalmente, dos quais 44% foram relatados como MDR. As taxas globais de amostras de *A. baumannii* MDR aumentaram durante o período do estudo, de 23% em 2004 para 63% em 2014. Mais de 50% das amostras de *A. baumannii* coletados na África, Oriente Médio e América Latina foram MDR. No geral, 95% das amostras de *A. baumannii* MDR eram resistentes à ceftriaxona, e aproximadamente 90% das amostras eram resistentes à ceftazidima, levofloxacina, meropenem e piperacilina-tazobactam.

Junqueira-Kipnis e Kipnis (2017) avaliaram em seu estudo 1333 pacientes em cinco UTIs, dos quais 56 pacientes desenvolveram infecções por *A. baumannii*. A maioria das amostras de *A. baumannii* foram resistentes a antimicrobianos β -lactâmicos, especificamente cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e carbapenêmicos, e 91,1% das amostras eram MDR.

Além da resistência aos β -lactâmicos, linhagens MDR de *A. baumannii* possuem a presença de genes que codificam enzimas modificadoras de antimicrobianos aminoglicosídeos dentro de integrons de classe 1. Este mecanismo de resistência prejudica a ligação de aminoglicosídeos ao seu alvo e confere resistência de alto nível a todos os aminoglicosídeos clinicamente úteis, incluindo gentamicina, tobramicina e amicacina (PELEG *et al.*, 2008).

Outros estudos relatam o aumento da resistência *in vitro* em linhagens de *A. baumannii* às polimixinas, antimicrobianos polipeptídeos com potente ação sobre bactérias Gram-negativas (GALES; JONES e SADER, 2001-2004; LI *et al.*, 2006).

I.1.3.1. Mecanismos de patogenicidade

A. baumannii é um dos patógenos mais importantes no ponto de vista clínico, apresentando diversos mecanismos que contribuem para a sua patogenicidade, tornando essa bactéria um grande desafio nos cuidados relacionados à saúde (LEE *et al.*, 2017). E vários desses mecanismos foram identificados por análises genômicas e fenotípicas, incluindo porinas da membrana externa, fosfolipases, proteases, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares, sistemas de secreção de proteínas e sistemas quelantes de ferro (ANTUNES *et al.*, 2011; LIN e LAN, 2014; LEE *et al.*, 2017).

I.1.3.1.1. Porinas

As porinas são proteínas da membrana externa associadas à modulação da permeabilidade celular. A principal porina em *A. baumannii* é a OmpA, também conhecida como Omp38, umas das porinas mais abundantes na membrana externa, sendo um fator de virulência bem caracterizado e com uma variedade de propriedades biológicas (McCONNELL *et al.*, 2013).

OmpA desempenha um papel importante na adesão e invasão de células epiteliais do hospedeiro, atingindo as mitocôndrias e induzindo a apoptose ao liberar moléculas proapoptóticas, como o citocromo C, um fator de indução de apoptose (LEE *et al.*, 2017). Além disso, OmpA interage com a fibronectina e consegue se ligar ao fator H, que é um regulador chave da via alternativa do complemento e está presente no soro humano, permitindo que *A.*

baumannii evite a morte mediada pelo sistema complemento. Esse fenômeno é conhecido como resistência sérica de *A. baumannii* (KIM *et al.*, 2009; SMANI *et al.*, 2012).

OmpA está relacionada com a resistência bacteriana, pois participa da absorção de vários antimicrobianos, como por exemplo, cloranfenicol, aztreonam e ácido nalidíxico, do espaço periplasmático através da membrana externa (SMANI *et al.*, 2014). A perda de OmpA resulta em permeabilidade reduzida a cefalosporinas, assim indicando o importante papel dessa porina na absorção desses antibióticos. Além disso, as proteínas da família OmpA têm sido implicadas em vários aspectos das interações patógeno-hospedeiro (Figura 1) (GEISINGER *et al.*, 2019).

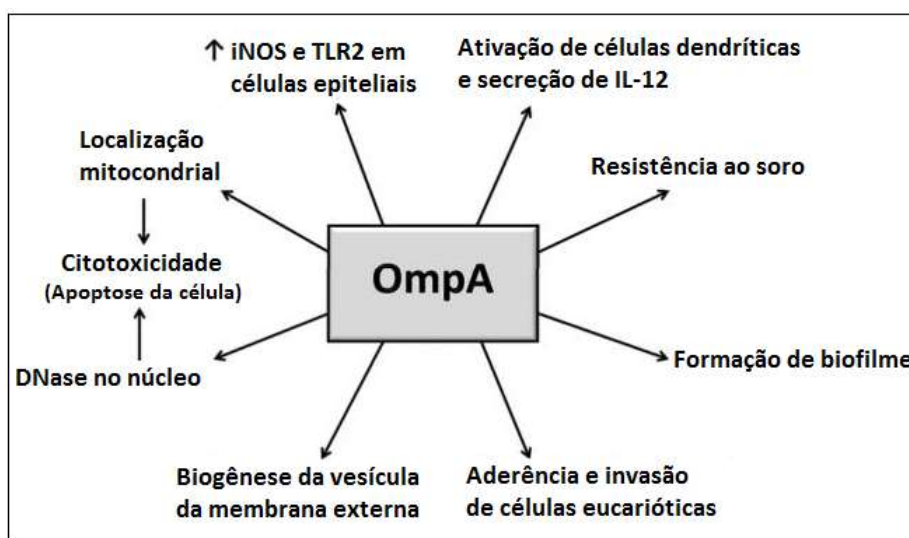


Figura 1: As múltiplas contribuições de OmpA para a patogênese de *A. baumannii*. Adaptado de Mortensen e Skaar, 2012, p. 12.

Outro importante papel de OmpA em relação a

A. baumannii, é melhorar a sobrevivência e persistência desse patógeno, pois facilita a motilidade superficial e a formação de biofilme (MCCONNELL *et al.*, 2013).

OmpA também regula a biogênese das vesículas da membrana externa e, portanto, é um alvo atraente para o desenvolvimento de novos antibióticos (Moon *et al.*, 2012). De acordo com dois relatórios, um baseado em imuno-proteômica e o outro em vacinologia reversa, o OmpA é um potencial candidato a antígenos para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias passivas contra infecções por *A. baumannii* (FAJARDO BONIN *et al.*, 2014; HASSAN *et al.*, 2016).

I.1.3.1.2. Cápsula

No que se refere aos fatores de patogenicidade, a cápsula polissacarídica é um dos componentes mais importantes para a patogenicidade de *A. baumannii*, sendo constituída de polissacarídeos de alto peso molecular, os quais são compostos pela união de vários açúcares, sintetizados pelos *clusters* gênicos com sequência variável denominado de locus K (GEISINGER *et al.*, 2019).

O locus K codificam as vias de biossíntese de açúcares comuns e específicos da linhagem, e esses açúcares geralmente não são encontrados em outras espécies. O *clusters* gênicos de biossíntese específicos de linhagens permitiram uma enorme diversidade na composição da cápsula de *A. baumannii* (GEISINGER *et al.*, 2019). Pelo menos 120 tipos únicos de locus K e cerca de 40 estruturas polissacarídicas distintas foram relatadas (HARDING *et al.*, 2018; KASIMOVA *et al.*, 2018).

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. O gene *wzc* (também referido como *ptk*), produz uma proteína tirosina quinase essencial ao processo de exportação da cápsula (KENYON *et al.*, 2013). 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).

Outro gene essencial para processo de síntese da cápsula e que está presente em nove tipos diferentes de locus K já descritos para *A. baumannii* é o gene *galU* que produz a proteína *glucose-1-phosphate uridylyltransferase* (UTP), um açúcar simples ligado a uridina difosfato (UDP). A proteína UTP é necessária para a construção das unidades de repetição dos glicanos que compõem a cápsula exopolissacarídica (GEISINGER e ISBERG, 2015; KENYON e HALL, 2013).

De acordo com Geisinger e Isberg (2015), os polissacarídeos capsulares estão envolvidos na resistência de *A. baumannii* e qualquer deficiência nesses polissacarídeos pode acarretar uma menor resistência intrínseca aos antibióticos peptídicos. Além disso, a presença do antibiótico induz a superexpressão do locus gênico K, gerando uma hiperprodução de polissacarídeos em consequência, aumentando a virulência e a habilidade da bactéria em superar o ataque do sistema do complemento. Dessa forma, infere-se que as alterações na expressão gênica desencadeadas pelo tratamento antibiótico inadequado fazem com que *A.*

baumannii faça a transição entre estados de baixo e alto potencial de virulência, o que pode contribuir para a natureza oportunista do patógeno.

Outra característica importante em relação a cápsula, é a hidrofobicidade e a carga negativa dos açúcares presentes na mesma que impedem a interação com a superfície do fagócito com carga negativa, diminuindo a deposição do complemento e a morte fagocítica (CRESS *et al.*, 2014; GEISINGER *et al.*, 2019). A cápsula protege as células do ambiente externo, aumentando a resistência à desinfecção e dessecação e promove a sobrevivência no soro humano e nos tecidos de camundongo como modelo animal (KENYON *et al.*, 2015). Estudos com *A. baumannii* demonstraram que interferir na biossíntese de cápsulas pode prejudicar na virulência (LEES-MILLER *et al.*, 2013; RUSSO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014; GEISINGER; ISBERG, 2015).

I.1.3.1.3. Vesículas de membrana externa (OMV's)

As vesículas de membrana externa (OMV's), são vesículas esféricas que medem de 20 a 200 nanômetros de diâmetro e estão presentes em várias bactérias patogênicas Gram-negativas (KULP; KUEHN, 2010). Essas vesículas são compostas de lipopolissacarídeos, membrana externa e proteínas periplásmicas, fosfolipídios e DNA ou RNA (LEE *et al.*, 2017), e atuam como veículos de entrega de efetores bacterianos para o interior das células hospedeiras, assim permitem que os patógenos interajam com o hospedeiro sem contato próximo entre bactérias e células hospedeiras (JUN *et al.*, 2013).

O interior das OMV's contém diferentes proteínas relacionadas à virulência (proteases, fosfolipases, superóxido dismutase e catalase) e a secreção dessas vesículas no sítio da infecção acelera a resposta imune inata local e, finalmente, leva a danos nos tecidos. As OMV's também aumentam a formação de biofilme em superfícies abióticas (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

Estudos demonstram que muitas linhagens de *A. baumannii* secretam OMV's contendo vários fatores de virulência, como por exemplo, OmpA (KWON *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2012), proteases e fosfolipases (KWON *et al.*, 2009).

OMV's são importantes para a patogênese de *A. baumannii*, pois uma linhagem de *A. baumannii* que produz OMV's abundantes com mais fatores de virulência induzem uma resposta imune inata mais forte e citotóxica em comparação com os de uma linhagem que produz menos OMVs (LI *et al.*, 2015).

De acordo com Jun e colaboradores (2013), OMV's purificadas de *A. baumannii* ATCC 19606 induzem a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais de uma maneira dose dependente. No entanto, as OMV's tratadas com proteinase não induzem um aumento significativo na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que as proteínas de membrana nas OMVs são responsáveis por provocar uma potente resposta do sistema imune inato.

Segundo Kwon e colaboradores (2009), além de ser um veículo de entrega de fatores de virulência, as OMV's também estão relacionadas com a propagação de genes de resistência a antimicrobianos, através da transferência horizontal. No estudo, as linhagens de *A. baumannii* que não expressavam o gene *bla_{OXA-24}*, que confere a bactéria maior resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, passaram a expressar o gene após serem adicionadas em um meio contendo OMV's carregando o gene *bla_{OXA-24}*.

I.1.3.1.4. Formação de Biofilme

O biofilme é uma estrutura tridimensional multicelular complexa na qual as células bacterianas associadas a uma superfície biótica ou abiótica, estão incorporadas em uma matriz autoproduzida de substância polimérica extracelular (SPE), constituída de carboidratos, ácidos nucléicos, proteínas e outras macromoléculas (SUBHADRA *et al.*, 2016).

O modo de vida de biofilme é um recurso comum à maioria dos microorganismos em sistemas naturais e médicos, que constitui um modo de crescimento protegido que permite a sobrevivência em ambientes sob condições estressantes (McDOUGALD *et al.*, 2012). Visto que *A. baumannii* pode produzir biofilme, o fenótipo de resistência pode ser atribuído à capacidade das linhagens clínicas de *A. baumannii* de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

Durante infecções de pele e tecidos moles, as populações de *A. baumannii* formam biofilmes robustos, tanto na ferida quanto em curativos oclusivos (THOMPSON, *et al.*, 2014). Além disso, *A. baumannii* também forma biofilme na maioria das superfícies abióticas, incluindo equipamentos associados a serviços de saúde, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais e tubos endotraqueais, no qual são constituídos de materiais como policarbonato e aço inoxidável (LONGO *et al.*, 2014; GREENE, *et al.*, 2016). Desse modo, o biofilme desempenha um papel importante nas interações de *A. baumannii* com seu hospedeiro,

pois a sua formação contribui para as infecções associadas ao dispositivos médicos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017).

Notavelmente, bactérias dentro de comunidades de biofilme, incluindo *A. baumannii*, aumentam a tolerância a estresses extracelulares (GREENE, *et al.*, 2016). E para sobreviver em condições desfavoráveis, tornam-se metabolicamente inertes nas camadas mais profundas do biofilme. Em consequência, há uma baixa penetração e a incapacidade dos antimicrobianos de agir sobre bactérias metabolicamente inertes (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018). Desse modo, o fenótipo de biofilme do patógeno promove a sobrevivência e a persistência das bactérias ao resistir aos antimicrobianos (SUBHADRA *et al.*, 2016).

O biofilme proporciona sobrevivência e resistência da bactéria aos antimicrobianos bem maiores em comparação a bactérias planctônicas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). Além disso, estudos têm revelado que a transferência de genes ocorre com maior frequência nos biofilmes, em comparação ao crescimento planctônico (SUBHADRA *et al.*, 2016).

A formação do biofilme é um processo de várias etapas, envolvendo a adesão de células bacterianas à superfície, seguida de agregação intercelular por exopolissacarídeo e proteínas específicas (SUBHADRA *et al.*, 2016).

A formação de biofilme e a motilidade superficial são controladas por um sistema denominado de *quorum sensing* (QS), no qual as células bacterianas regulam a expressão gênica e se coordenam em resposta a liberação e detecção de moléculas sinalizadoras dependente da densidade celular (STACY *et al.*, 2012; SUBHADRA *et al.*, 2016). O sistema QS é mediado muitas vezes por duas proteínas, pertencentes à família de proteínas *LuxI* e *LuxR*. O gene *luxI* sintetiza N-acil-homoserina lactonas (AHLs) 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 (STACY *et al.*, 2012).

Além disso, a formação do biofilme está relacionada com a expressão de vários fatores de patogenicidade, incluindo os genes do locus *csu* (que codifica uma chaperona-usher fimbrial, organelas de superfície adesiva), o locus *pga* (que codifica o polissacarídeo extracelular poli- β -(1,6)-N-acetilglucosamina [PNAG]), *ompA* e *omp33* (que codificam proteínas de membrana externa e estão associados à indução de apoptose em células eucariotas) e o *bap* (que codifica as proteínas associadas a formação de biofilme em superfícies abióticas [Bap]) (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; GEISINGER *et al.*, 2019).

I.1.3.2. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *A. baumannii*

Algumas linhagens de *A. baumannii* tornaram-se resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, principalmente por meio da aquisição de plasmídeos, transposons ou integrons, carregando conjuntos de genes que codificam resistência a várias famílias de antimicrobianos de uma só vez, principalmente aqueles disponíveis no mercado, desse modo, restringindo bastante a capacidade de tratar efetivamente pacientes críticos (FOURNIER *et al.*, 2006; HARDING *et al.*, 2017; KANAFANI e KANJ, 2018).

A. baumannii apresenta uma competência natural de adquirir genes de resistência por meio de transmissão horizontal de genes, e isso explica a sua alta capacidade de resistência a antimicrobianos (TRAGLIA *et al.*, 2016).

Dentre os principais mecanismos de resistência utilizados por *A. baumannii*, destacam-se a produção de beta-lactamases, alterações na permeabilidade da membrana, e com menor frequência, superexpressão de bombas de efluxo. Os genes relacionados a estes tipos de fenótipos podem surgir através de mutação ou recombinação, localizando-se neste caso, em elementos genéticos móveis (OIKONOMOU *et al.*, 2015).

I.1.3.2.1. Produção de beta-lactamases

As linhagens de *A. baumannii* MDR têm sido isoladas com frequência, e a produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência da espécie (LEE *et al.*, 2017). As beta-lactamases, são enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel betalactâmico (WALSH *et al.*, 2003; SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Os betalactâmicos como as cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactamas e penicilinas podem ser hidrolisados por vários membros da família das enzimas beta-lactamases, que degradam esses antimicrobianos interferindo na permeabilidade do fármaco e/ou alterando a afinidade do alvo antimicrobiano, assim resultando em compostos microbiologicamente ineficazes (ELIOPOULOS e BUSH, 2001; POIREL e NORDMANN, 2006).

De acordo com Ambler e colaboradores (1980), as beta-lactamases são classificadas em quatro classes (A a D), com base em suas sequências de aminoácidos. As beta-lactamases que pertencem às classes A, C e D são serina beta-lactamases que possuem serina no sítio ativo, e aquelas que pertencem à classe B são metalo-betalactamases que requerem zinco no sítio ativo ou outro metal pesado para catálise.

As carbapenemases são um grupo fenotípico de enzimas, uma mistura heterogênea de β -lactamases pertencentes à classe molecular de Ambler sendo a classe A (penicilinases), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinases). Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar os antimicrobianos carbapenêmicos, além de decompor outras penicilinas e cefalosporinas (JEON *et al.* 2015).

A classe A de Ambler é um dos grupos de beta-lactamases mais estudados, e geralmente são inibidas por inibidores de β -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Além disso, beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) pertencem à classe A de Ambler e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, exceto cefamicinas, podendo conferir resistência em baixos níveis aos carbapenêmicos, com exceção de algumas enzimas do tipo KPC (JEON *et al.*, 2016). A classe A de beta-lactamases que foram identificados em *A. baumannii*, são: TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC e CARB, sendo que TEM-1, CARB-4 e SCO-1, apresentam espectro restrito, enquanto outras enzimas, como por exemplo, PER-1, TEM-92, CARB-10, SHV-5, PER-2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 e PER-7, são beta-lactamases de espectro estendido (ESBL's). Algumas carbapenemases, como GES-14 e KPC-2, foram detectadas em *A. baumannii* (LEE *et al.*, 2017).

Na classe A 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. Tais classes de enzimas conseguem 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).

Já a classe B de beta-lactamases de Ambler, as metalo-beta-lactamases (MBLs), são uma das principais enzimas relacionadas com a redução da sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e que vem sendo descritas em amostras de *Acinetobacter* spp. desde o início da década de 90 (POIREL *et al.*, 2000). Devido a um amplo espectro de substrato, as MBL's catalisam a hidrólise de praticamente todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, mas não monobactamas (JEON *et al.*, 2015).

Em *A. baumannii* uma variedade das beta-lactamases da classe B foram identificadas, como por exemplo, IMP, VIM, SPM, SIM, DIM, KHM e NDM (CASTANHEIRA *et al.*, 2004; JACOBY; MUNOZ- PRICE, 2005; LEE *et al.*, 2005; YONG *et al.*, 2007; SEKIGUSHI *et al.*,

2008; YONG *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2010; BUSH, 2010). No entanto, as famílias de maior relevância clínica são a SIM, IMP, VIM e a NDM, que podem estar presente em uma variedade de integrons e serem transferidas geneticamente. Todas essas famílias já foram descritas em *A. baumannii*, exceto a SIM (PILLONETTO *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2014; SILVA e DOMINGUES, 2016).

A classe C de Ambler, engloba a produção de beta-lactamases do tipo AmpC que representam um problema terapêutico porque podem conferir resistência às cefamicinas (ex. cefoxitina e cefotetan), penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações, monobactâmicos (aztreonam) e combinações de inibidores de beta-lactamase, mas não são significativamente inibidas pelos inibidores da beta-lactamase usados clinicamente, como o ácido clavulânico (JEON *et al.*, 2015).

A. baumannii possui uma cefalosporinase AmpC intrínseca, assim como vários isolados clínicos de *A. baumannii* que apresentam o gene ampC transcrito a partir de um promotor forte contido em um elemento de sequência de inserção putativo (sequência semelhante a *ISAbal*), que resulta em alta resistência à ceftazidima. Essa sequência foi identificada em isolados de *A. baumannii* resistentes à ceftazidima, mas está ausente em isolados de *A. baumannii* suscetíveis à ceftazidima (LEE *et al.*, 2017).

Em relação a classe D de beta-lactamases, são chamadas de OXA's (oxacilinas) porque geralmente hidrolizam a oxacilina isoxazolilpenicilina muito mais rapidamente que a benzilpenicilina (JEON *et al.*, 2015).

Os genes para produção destas enzimas encontram-se em elementos móveis do DNA bacteriano, tornando esses genes potencialmente transferíveis entre microrganismos da mesma espécie ou para outras espécies, portanto, é algo que causa preocupação (FERREIRA, 2010).

As OXA's são as mais prevalentes, apresentando mais de 400 tipos descritos em todo o mundo, entretanto, quatro grupos de carbapenemase são destacadas devido à sua maior frequência e importância: OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-51 (WALTHER-RASMUSSEN e HØIBY, 2006; LIN e LAN, 2014). Um exemplo é o subgrupo OXA-23 que foi detectado em vários países de todos os continentes, inclusive no Brasil (DALLA-COSTA *et al.*, 2003; NAAS *et al.*, 2005; JEON, *et al.*, 2005).

Os subgrupos de OXAs hidrolisantes de carbapenem, como os subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58, são predominantes em *A. baumannii*. O gene *bla*_{OXA-23} foi disseminado em todo o mundo e a frequência de linhagens de *A. baumannii* produtoras de OXA-

23 é significativamente alta (LEE *et al.*, 2017). OXA-23 é a beta-lactamase mais difundida globalmente, especialmente no Brasil, onde é endêmica (PAGANO *et al.*, 2016).

Foi relatado que a inserção de *ISAbal* na sequência do promotor *bla*OXA-23 está associada à superexpressão de *bla*OXA-23, *bla*OXA-51 ou *bla*OXA-58 em *A. baumannii* (TURTON *et al.*, 2006). Além disso, um relatório da Índia mostrou que *bla*OXA-51 e *bla*OXA-23 estavam presentes em todos os 103 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos e quase 80% dos isolados tinham *ISAbal* a montante do gene *bla*OXA-23, indicando a prevalência da inserção de *ISAbal* (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2016)

I.1.3.2.2. Enzimas modificadoras de Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas de amplo espectro que inibem a síntese de proteínas pela ligação à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, resultando na liberação de proteínas prematuras pela leitura incorreta do mRNA (KRAUSE *et al.*, 2016).

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

As aminoglicosidases são enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME's) e podem ser classificadas em acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases. Atuam diminuindo a sua afinidade de ligação às unidades ribossômicas do RNA das bactérias (ZAVASCKI *et al.*, 2010). Essas enzimas são codificadas por genes que estão associados aos integrons de classe 1 e geralmente são transferidas entre bactérias patogênicas (LIN e LAN, 2014).

As AME's são o principal mecanismo pelo qual *A. baumannii* adquire resistência aos aminoglicosídeos. Essas enzimas mutadas inativam o fármaco e impedem a ligação ribossômica, catalisando a modificação nos grupos hidroxil ou amino dos agentes antibacterianos (NASR, 2020). Além disso, muitos isolados MDR de *A. baumannii* produzem uma combinação de AME's (LIN e LAN, 2014). Um estudo da China identificou uma linhagem de MDR *A. baumannii* carregando quatro enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (ZHU *et al.*, 2009).

I.1.3.2.3. Resistência às Polimixinas

As polimixinas são um grupo de antimicrobianos peptídicos policatiônicos que foram descobertos há mais de 60 anos e apresentam potente eficácia contra a maioria das bactérias Gram-negativas (LIU *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016).

Esses antimicrobianos interferem na propriedade de permeabilidade seletiva das membranas bacterianas após a ligação aos lipopolissacarídeos (LPS's), interagindo com o lipídio A da membrana externa e agindo como detergente, interrompendo os fosfolípidios da membrana, causando permeabilidade e morte celular (PEREZ *et al.*, 2007).

Entre todas as cinco polimixinas (A – E), somente polimixina B e E (colistina) com uma diferença de um aminoácido são usadas clinicamente. A colistina é um componente essencial das terapias combinadas usadas para tratar infecções por *A. baumannii* MDR (CAI *et al.*, 2012).

As polimixinas são consideradas os medicamentos de último recurso para infecções por *A. baumannii* que são resistentes a todas as outras classes de antimicrobianos. No entanto, a resistência emergente contra as polimixinas por *A. baumannii*, provavelmente causada devido a modificações na membrana de lipopolissacarídeo, tem limitado as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por este patógeno. Além disso, a resistência a combinações antimicrobianas, incluindo ceftazidima-avibactam, piperacilina-tazobactam e ampicilina-sulbactam, reduz ainda mais as possíveis intervenções clínicas (LEE *et al.*, 2017; THOMAS *et al.*, 2019).

I.1.3.2.4. Resistência a Tigeciclina

A tigeciclina é o primeiro antibiótico da classe das gliciliclinas que exibe atividade bacteriostática ao se ligar à subunidade ribossômica 30S e é ativo contra infecções por *A. baumannii* (LEE *et al.*, 2017). Além disso, a tigeciclina, minociclina e colistina estão entre os poucos antibióticos restantes para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR (ARDEHALI *et al.*, 2019).

Entretanto, a resistência de *A. baumannii* à tigeciclina está relacionada a superexpressão de bombas de efluxo RND codificadas cromossomicamente (ARDEHALI *et al.*, 2019). Estudos publicados anteriormente descobriram que a superexpressão de três bombas RND principais (*AdeABC*, *AdeFGH* e *AdeIJK*), contribuem para a resistência a estes antimicrobianos em isolados clínicos de *A. baumannii* (HORNSEY *et al.*, 2010, 2011).

I.1.4. Família *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família de bastonetes Gram-negativos não esporulados; com representantes móveis por meio de flagelos peritríquios e não móveis, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, catalase positivos, reduzem nitratos em nitritos, e produzem ácido a partir da fermentação da glicose. Em média, medem 2-4 µm de comprimento por 0,4-0,6 µm de largura, com extremidades arredondadas e tempo de geração *in vitro* entre 20 e 30 minutos (OCTAVIA; LAN, 2014).

A distinção entre membros dessa família tem sido historicamente baseada em características bioquímicas e em similaridades da sequência do gene 16S rRNA. No entanto, a presença de características sobrepostas e o baixo poder discriminatório da análise da sequência 16S rRNA, torna necessário o uso de técnicas de identificação adicionais, como resultado, a taxonomia das Enterobactérias sofreu muitas mudanças nas últimas décadas (ALNAJAR; GUPTA, 2017; MORALES-LÓPEZ *et al.*, 2019;).

A ordem *Enterobacteriales*, anteriormente conhecida como "*Enterobacteriales*", consistia em uma única família *Enterobacteriaceae* abrangendo mais de 60 gêneros e contendo mais de 250 espécies validamente publicadas (LAPAGE *et al.*, 1992). No entanto, Adélou e colaboradores (2006), com base em análises filogenéticas e análise de características moleculares conservadas, propuseram a mudança do nome da ordem de "*Enterobacteriales*" para *Enterobacteriales*, de modo que o nome da ordem estivesse de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias. Esse estudo também levou a divisão da única família *Enterobacteriaceae* em outras sete famílias distintas: *Enterobacteriaceae* (RAHN, 1937), *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov. e *Budviciaceae* fam. nov. (ADEOLU *et al.*, 2016).

As recém delimitadas *Enterobacteriaceae* ainda constituem a maior família dentro da ordem *Enterobacteriales* (ADEOLU *et al.*, 2016). É composta por 28 gêneros e mais de 75 espécies validamente publicadas, muitas das quais são patógenos de grande relevância clínica, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* entérica (ALNAJAR; GUPTA, 2017).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são ubíquos na natureza, e muitas de suas espécies vivem no intestino de humanos e animais, incluindo insetos, onde podem causar

doenças entéricas ou permanecer como organismos comensais. Essas bactérias também desempenham um papel como patógenos de vegetais. Entretanto, nem todas as espécies de um mesmo gênero são patógenos, apenas um pequeno grupo de espécies é considerado patógeno estrito (MORALES-LÓPEZ *et al.*, 2019).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* ocupam um conjunto diversificado de nichos e, portanto, estão associadas a uma série de doenças humanas, animais e vegetais, epidemias e infecções (ALNAJAR; GUPTA, 2017), e representam aproximadamente 80% das bactérias Gram-negativas isoladas de amostras clínicas (KONEMANN *et al.*, 2008; OCTAVIA; LAN, 2014).

As enterobactérias estão entre os principais patógenos bacterianos causadores de IRAS no mundo, sendo responsáveis principalmente por infecções do trato urinário, da corrente sanguínea, pneumonias, infecções intra-abdominais como a peritonite, meningites e infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos (POIREL, 2012).

De acordo com o CDC (2013), as infecções intratáveis e difíceis de tratar causadas por bactérias *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) estão aumentando entre os pacientes em instalações médicas. As ERC tornaram-se resistentes a quase todos os antibióticos que temos atualmente, incluindo carbapenêmicos, que são frequentemente considerados os antibióticos de último recurso. Como consequência, a cada ano, aproximadamente 600 mortes resultam de infecções causadas pelos dois tipos mais comuns de ERC, *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* resistentes ao carbapenem, um antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos. Quase metade dos pacientes hospitalizados com infecções da corrente sanguínea causadas por bactérias ERC morrem da infecção.

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas é generalizada entre as enterobactérias e emergiu como um grande desafio, pois esses antibióticos são importantes classes de medicamentos usados para tratar infecções causadas por integrantes da família *Enterobacteriaceae* (OCTAVIA; LAN, 2014). E grande parte do aumento da resistência a esses antimicrobianos foi atribuída à rápida disseminação de elementos genéticos transmitidos por plasmídeo que codificam enzimas beta-lactamases (MORALES-LÓPEZ *et al.*, 2019).

As beta-lactamases mais recentes encontradas em *Enterobacteriaceae* incluem beta-lactamases AmpC, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL's) (por exemplo, cefotaxima isolada pela primeira vez nos tipos Munique [CTX-M]) e carbapenemases (por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase [KPC] e as metalo-b-lactamases [MBL's] e os tipos de oxacilinase [OXA]) (OCTAVIA; LAN, 2014).

Uma grande variedade enterobactérias são produtoras da enzima KPC, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Citrobacter braakii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp., e *Raoultella ornithinolytica*. No entanto, a representante mais crítica produtora da enzima KPC é *K. pneumoniae*, principalmente devido a transmissão horizontal do gene *blaKPC* por meio do *transposon Tn4401*, um *transposon* ativo e inespecífico para uma variedade de plasmídeos conjugáveis (MAVROIDI *et al.*, 2015; KAZMIERCZAK *et al.*, 2016).

As infecções causadas por CRE têm aumentado significativamente em todo o mundo, desde o seu primeiro registro nos Estados Unidos, em 1996, com uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de KPC, levando a surtos nos continentes: europeu, asiático e americano (CAMPOS *et al.*, 2016; PAPAGIANNITSIS *et al.*, 2016).

I.1.5. Gênero *Klebsiella*

O microbiologista alemão Edwin Klebs, no final do século XIX, foi o primeiro a descrever o gênero *Klebsiella* (KONEMAN *et al.*, 2008). No entanto, o bacilo isolado dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia, também foi descrito por Carl Friedlander em 1882 (FRIEDLÄNDER, 1882). Este foi o primeiro registro do isolamento de *Klebsiella* spp., o gênero foi nomeado quatro anos mais tarde, em 1886, em homenagem à Edwin Klebs (FRIEDLÄNDER, 1882; DE ROSA *et al.*, 2015).

Atualmente, o gênero é composto por 23 espécies e 8 subespécies e está inserido no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gamma proteobacteria e família *Enterobacteriaceae* (EUZÉBY, 2020).

O gênero *Klebsiella* consiste em bastonetes Gram-negativos, não móveis, aeróbicos e facultativamente anaeróbicos, geralmente encapsulados, variando de 0,3 a 1,0 µm de largura a 0,6 a 6,0 µm de comprimento, produzem colônias grandes e mucóides, quando cultivados em placas com nutrientes como cisteína, e coloração variável de amarelo a branco azulado (PATERSON; SIU; CHANG, 2014).

A formação de colônias grandes em *Klebsiella* spp. é devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege contra a ação de fatores bactericidas, fagocitose pelo sistema complemento, e tem função de auxiliar na aderência bacteriana (MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Klebsiella spp. são encontradas de forma ubíqua na natureza, incluindo água, solo e animais, e podem colonizar dispositivos médicos e o ambiente de saúde (BENGOCHEA; SA PESSOA, 2019).

A identificação presuntiva de espécies do gênero *Klebsiella* geralmente é feita através de testes bioquímicos, como por exemplo, produção de indol, Ornitina descarboxilase, lisina descarboxilase, degradação de pectato, mevalonato, teste de Voges-Proskauer, e entre outros. Elas produzem lisina descarboxilase, mas não ornitina descarboxilase, com exceção da espécie *Klebsiella ornithinolytica* e são geralmente positivas no teste de Voges-Proskauer (PATERSON; SIU; CHANG, 2014).

Do ponto de vista clínico, as espécies do gênero *Klebsiella* que representam importantes patógenos no ambiente hospitalar causando um grande número de infecções são *Klebsiella pneumoniae* (espécie que apresenta maior prevalência e relevância clínica) e subespécies *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis*; seguida da espécies como *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* e *Klebsiella oxytoca* (PATERSON; SIU; CHANG, 2014; RUSSO; MARR, 2019).

I.1.6. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um bastonete Gram-negativo, encapsulado, sem capacidade móvel e anaeróbica facultativa. Seu isolamento inicial ocorreu no século 19, sendo descrita nesse período como “Friedlander’s bacterium” (PACZOSA; MECSAS, 2016; RUSSO; MARR, 2019). Pode ser facilmente encontrada no meio ambiente, como no solo, nas águas superficiais e também em dispositivos médicos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

A síndrome clínica de pneumonia de Friedlander foi eventualmente reconhecida como devida a *K. pneumoniae*. O agente etiológico dessa condição clínica foi descrito pela primeira vez em 1882 por Friedlander, daí a designação inicial como bacilo de Friedlander (*Bacillus friedlanderii*) (FRIEDLÄNDER, 1882). Uma designação subsequente e agora antiquada foi *Bacillus mucosus capsulatus* (BENSLEY, 1932). A síndrome aguda tem uma série de características clínicas distintas que são consistentes com algumas, senão todas, das linhagens agressoras sendo hvKp ou pelo menos isolados de *K. pneumoniae* que adquiriram uma parte do repertório do fator de virulência hvKp (RUSSO; MARR, 2019).

Uma característica importante de *K. pneumoniae* que possibilitou sua evolução contínua é a capacidade de adquirir novo material genético. Como resultado, dois patotipos denominados

K. pneumoniae clássica (cKp) e *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKp) estão circulando atualmente, cada um dos quais apresenta desafios únicos para o clínico (ALYSSA; RAJINDER; THOMAS, 2013).

Ambos os patótipos são patógenos globais, porém a incidência de infecções devido ao hvKp tem aumentado exponencialmente nas últimas três décadas em países que compõem a Orla do Pacífico Asiático (TSAI *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2012). Em contraste, até o momento, cKp tem sido o agente agressor dominante nos países ocidentais, entretanto, as infecções por hvKp são cada vez mais reconhecido fora da Ásia (FAZILI *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2018).

O patotipo hvKp está relacionado com infecções em indivíduos saudáveis da comunidade, ao passo que é incomum o desenvolvimento de infecções por cKp nessa população. Contudo, pessoas saudáveis podem ser colonizadas com cKp, mas na ausência de alguma forma de comprometimento do hospedeiro, raramente ocorre infecção (RUSSO; MARR, 2019).

A equipe médica está mais familiarizada com a cKp, que é um patógeno oportunista responsável por IRAS principalmente em indivíduos com comorbidades, imunocomprometidos ou que têm quebra de barreira existente (por exemplo, dispositivos médicos intravasculares, tubo endotraqueal ou ferida cirúrgica) (RUSSO; MARR, 2019).

Historicamente, *K. pneumoniae* causou infecções graves principalmente em indivíduos imunocomprometidos, mas o recente surgimento e disseminação de linhagens hipervirulentas ampliou o número de pessoas suscetíveis, desse modo, incluindo aquelas pessoas que são saudáveis e imunossuficientes (PACZOSA; MECSAS, 2016). Além disso, esse microrganismo também é responsável por um número significativo de infecções adquiridas na comunidade em todo o mundo (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019).

K. pneumoniae possui predisposição a ocasionar infecções com aspecto benigno na superfície mucosa do trato gastrointestinal (GI) e orofaringe, sendo esses os pontos de partida para a invasão dos demais tecidos e assim o surgimento de quadros infecciosos mais graves (PACZOSA; MECSAS, 2016). Tal fato é possível devido à possibilidade de modular o sistema imune nos diferentes colonizados e impedir sua ação (MATASEJE; BOYD; MULVEY; LONGTINB, 2019; PACZOSA; MECSAS, 2016; RUSSO; MARR, 2019).

É uma bactéria extremamente resiliente e o sucesso como patógeno parece seguir o modelo de “a melhor defesa para um patógeno é uma boa defesa” em vez de “a melhor defesa para um patógeno é um bom ataque”. Isso é exemplificado pela capacidade dessas bactérias de

evadir, sobreviver, em vez de suprimir ativamente, muitos componentes do sistema imunológico e crescer em muitos locais nos hospedeiros (PACZOSA; MECSAS, 2016).

As linhagens de *K. pneumoniae* podem provocar infecções extrapulmonares na presença ou ausência de pneumonia. Desse modo, estão relacionadas a uma variedade de infecções do trato urinário, abscesso renal, abscesso hepático, osteomielite, trombose do seio cavernoso, abscesso do bulbo jugular, meningite, abscesso cerebral, infecção esplênica, peritonite bacteriana espontânea e abscessos de tecidos moles no pescoço e braço (PACZOSA; MECSAS, 2016; RUSSO; MARR, 2019).

As características definidoras das infecções por *K. pneumoniae* são a capacidade de propagação metastática e sua morbidade e mortalidade significativas (PACZOSA; MECSAS, 2016).

De acordo com o estudo de Falagas e colaboradores (2014), o cálculo de 26%–44% das mortes em 7 estudos foram atribuíveis à resistência aos carbapenêmicos, e em 2 estudos, que incluíram bacteremia e outras infecções, -3% e -4% das mortes foram atribuíveis à resistência aos carbapenêmicos. Os resultados agrupados mostraram que o número de mortes foi significativamente maior em pacientes com infecções resistentes a carbapenêmicos e que o número de mortes atribuíveis à resistência a esses antimicrobianos é considerável.

Nos estudos de Xu e colaboradores (2017), a taxa mortalidade entre 2.462 pacientes infectados com *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (CRKP) foi de 42,14% versus 21,16% de mortalidade em pacientes infectados com *K. pneumoniae* suscetível a carbapenem (CSKP). A mortalidade dos pacientes com infecção da corrente sanguínea ou infecção do trato urinário foi de 54,30 e 13,52%, respectivamente, e 48,9 e 43,13% nos pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) ou submetidos a transplante de órgãos sólidos. A mortalidade foi de 47,66% nos pacientes infectados com *K. pneumoniae* produtora da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e 46,71% naqueles infectados com *K. pneumoniae* produtora de VIM. Além disso, geograficamente, a mortalidade relatada em estudos da América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia foi de 33,24, 46,71, 50,06 e 44,82%, respectivamente.

Os pacientes infectados com CRKP tiveram mortalidade bruta em 30 dias significativamente maior em comparação com CSKP (32,65% vs. 15,92%); no entanto, o número médio de dias até a morte foi semelhante para ambos os grupos (CRKP 6 dias vs. CSKP 10,5 dias, $p = 0,556$) (CIENFUEGOS-GALLET *et al.*, 2019).

K. pneumoniae ganhou notoriedade como um agente infeccioso devido a um aumento no número de infecções graves e a crescente escassez de tratamentos eficazes. Estas

concernentes circunstâncias estão relacionadas ao surgimento de linhagens de *K. pneumoniae* que adquiriram características genéticas adicionais e se tornaram hipervirulento (HV) ou resistente a antimicrobianos (PACZOSA; MECSAS, 2016; RUSSO; MARR, 2019).

Nas últimas décadas, houve um aumento preocupante em relação a aquisição de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos por linhagens derivadas da “clássica” *K. pneumoniae*. Como consequência, infecções simples, como infecções do trato urinário (ITU), tornaram-se recalcitrantes ao tratamento e infecções mais sérias, como pneumonias e bacteremias, tornaram-se cada vez mais fatais (KUEHN, 2013; PACZOSA; MECSAS, 2016).

I.1.6.1. Mecanismos de patogenicidade

Dentre os principais fatores de patogenicidade associados a *K. pneumoniae* destacam-se as cápsulas polissacarídicas, produção de lipopolissacarídeos (LPS), e a expressão de fímbrias adesivas do tipo 1 ou 3 e sideróforos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

I.1.6.1.1. Cápsula

A cápsula, uma matriz polissacarídica que reveste a célula, é necessária para a virulência de *K. pneumoniae* e é indiscutivelmente o fator de virulência mais estudado (RUSSO; MARR, 2019). Com base na composição dos polissacarídeos capsulares de *K. pneumoniae*, são conhecidos 78 sorotipos capsulares distintos (K1 a K78). No entanto, a grande maioria das linhagens de hvKp pertence aos serotipos K1 e K2 (PIPERAKI *et al.*, 2017).

A hipercápsula é produzida por linhagens hvKp, sendo caracterizada como uma cápsula hipermucoviscosa relacionado ao gene *rmpA* (regulador desse fenótipo mucóide A), que consiste em um revestimento bacteriano de exopolissacarídeo mucoviscoso mais robusto que o da cápsula típica. Esta hipercápsula pode contribuir significativamente para a patogenicidade de hvKp (RUSSO; MARR, 2019).

Algumas linhagens de *K. pneumoniae* podem modificar o LPS a um grau que não é reconhecido pelas células hospedeiras e outras podem usar a cápsula para mascarar o LPS da detecção por receptores toll-like (TLR4). Essas modificações promovem a redução das resposta inflamatórias e diminuem a depuração bacteriana (PIPERAKI *et al.*, 2017).

De acordo com estudos, as linhagens acapsulares de *K. pneumoniae* são drasticamente menos virulentas do que as linhagens isogênicas encapsuladas em modelos de camundongos, com base na diminuição cargas bacterianas nos pulmões, menores taxas de mortalidade de camundongos e uma incapacidade da bactéria de se espalhar sistemicamente (167, CORTÉS *et al.*, 2002; LAWLOR; HANDLEY; MILLER 2005-2006).

I.1.6.1.2. Lipopolissacarídeo (LPS)

LPS, também conhecido como endotoxina, é um componente principal e necessário da membrana externa da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas. Apenas 9 tipos diferentes de antígenos O foram identificados em isolados de *K. pneumoniae*, e O1 é o mais comum. A falta de antígeno O pode tornar *K. pneumoniae* sensível à morte mediada por complemento na corrente sanguínea, tornando a cepa menos virulenta (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Estudos demonstram que o LPS auxilia na patogênese de *K. pneumoniae*, pois protege as células bacterianas contra a fagocitose, atividade bactericida mediada pelo complemento, peptídeos antimicrobianos e contribui com uma maior virulência em pneumonia de camundongo, infecção sistêmica e modelos de desafio orogástrico (PAN *et al.*, 2011; HSIEH *et al.*, 2012; MARCH *et al.*, 2013; MILLS *et al.*, 2017; KIDD *et al.*, 2017).

O gene *uge* está envolvido na produção adequada de LPS, sendo encontrado na maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, incluindo linhagens comensais e causadoras de doenças, e na ausência desse gene, é produzido um LPS áspero que é menos capaz de causar ITU, pneumonia e sepse do que as linhagens com a presença desse gene (PACZOSA; MECSAS, 2016).

I.1.6.1.3. Fímbrias

As fímbrias representam um dos principais fatores de patogenicidade de *K. pneumoniae* e são mediadores importantes da adesão desse microrganismo. Em *K. pneumoniae*, as fímbrias tipo 1 e 3 são as principais estruturas adesivas, porém as fímbrias do tipo 1 são expressas em 90% dos isolados de *K. pneumoniae* clínicos e ambientais, bem como quase todos os membros das *Enterobacteriaceae* (PACZOSA; MECSAS, 2016).

K. pneumoniae consegue regular a expressão de suas fímbrias tipo 1 de acordo com o ambiente. Desse modo, os genes de fímbria tipo 1 são expressos no trato urinário, mas não no trato gastrointestinal ou nos pulmões. As fímbrias do tipo 1 contribuem para as ITUs, para a invasão das células da bexiga por *K. pneumoniae* e para a formação de biofilme na bexiga durante a ITU em um sistema modelo de camundongo (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008-2009).

Em *K. pneumoniae*, fímbrias tipo 3 são expressos durante a formação de biofilme em cateteres, porém nenhum tipo de fímbria é expresso enquanto *K. pneumoniae* é planctônica. Além disso, em modelos de biofilme de *K. pneumoniae*, as fímbrias do tipo 3, mostraram ser cruciais para a produção de biofilme (PACZOSA; MECSAS, 2016).

I.1.6.1.4. Sideróforos

A capacidade de *K. pneumoniae* de captar ferro do hospedeiro é crítica para seu crescimento e replicação. Em *K. pneumoniae* quatro moléculas de aquisição de ferro, os sideróforos, foram descritas: enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina e aerobactina (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Estudos epidemiológicos moleculares mostraram que sideróforos com a salmotelina, a yersiniabactina e a aerobactina estão mais comumente presentes em linhagens de hvKp do que em linhagens de cKp. A yersiniabactina também está presente em linhagens de cKp, enquanto a salmoquelina e a aerobactina são específicas para hvKp (LAM *et al.*, 2018; RUSSO; MARR, 2019).

A enterobactina tem a maior afinidade pelo ferro e está presente tanto em linhagens clássicas quanto hipervirulentas de *K. pneumoniae*, sendo considerada o sistema primário de captação de ferro nestes microrganismos. Entretanto, esse sideróforo é inativado pela proteína do hospedeiro lipocalina 2, portanto, é improvável que a enterobactina desempenhe um papel na infecção sistêmica (RUSSO; MARR, 2019; HSIEH *et al.*, 2012).

I.1.6.2. Mecanismos relacionados a resistência aos Carbapenêmicos por *K. pneumoniae*

Os principais mecanismos de resistência a antimicrobianos comumente observados em *K. pneumoniae* são: a expressão de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), que tornam essas bactérias resistentes às cefalosporinas e monobactamas; e o outro mecanismo de

resistência, que é ainda mais preocupante, é a expressão de carbapenemases por *K. pneumoniae*, que torna as bactérias resistentes a quase todos os beta-lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos (PACZOSA; MECSAS, 2016; RUSSO; MARR, 2019).

A resistência aos carbapenêmicos, a principal classe antimicrobianos de última linha utilizados para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*, é um fato preocupante. A rápida expansão de *K. pneumoniae* deve-se a produção de enzimas carbapenemases como KPC, que hidrolisam os carbapenêmicos e outros antibióticos β -lactâmicos em vários graus (DAVID *et al.*, 2019). Das muitas variantes diferentes da família KPC (KPC-1 a KPC-22), o as variantes mais bem caracterizadas são KPC-2 e KPC-3 (TANGDEN; GISKE, 2015).

As carbapenemases de classe A, como as enzimas KPC, foram identificadas em todo o mundo em *K. pneumoniae*. Vários carbapenemases de classe B e D também foram detectados em *K. pneumoniae* MDR adquirida em hospital, onde carbapenemases de classe C raramente foram relatados (TANGDEN; GISKE, 2015).

Os genes *blaKPC* da carbapenemase estão associados a elementos móveis (transposon do tipo Tn3, Tn4401) que podem se espalhar horizontalmente dentro e entre as espécies bacterianas como por exemplo, as bactérias Gram-negativas, e isso facilitou sua ampla disseminação geográfica. Os plasmídeos que carregam *blaKPC* também estão frequentemente associados a determinantes de resistência a outros antimicrobianos (ARNOLD *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2017).

O surgimento da resistência aos carbapenêmicos é um fenômeno mundial que ocorre em ambientes clínicos, urbanos e agrícolas (WALSH *et al.*, 2011; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

A epidemiologia de *K. pneumoniae* produzindo KPC's apresenta variações geográficas. A disseminação endêmica dessas bactérias foi relatada nos EUA, China, Itália, Polônia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013).

Nos EUA, em 2001, o primeiro isolado de *K. pneumoniae* produtor de KPC foi relatado na Carolina do Norte, desde então, a produção de enzimas KPC se tornou o mecanismo mais prevalente de resistência aos carbapenem nos EUA atualmente (YIGIT *et al.*, 2001). A enzima (KPC-1), uma beta-lactamase Ambler classe A, não foi a primeira carbapenemase a ser detectada em *K. pneumoniae*, uma vez que esses isolados também abrigam MBL's Ambler classe B capazes de hidrolisar carbapenêmicos, que foram relatados anteriormente no Japão no início de 1994 (ARNOLD *et al.*, 2011).

Na Itália, que é um país do sul da Europa onde a KPC está se tornando endêmica, 89,5% dos produtores de carbapenemase foram relatados como tendo enzimas do tipo KPC, seguidas por VIM-1 (9,2%) e OXA-48 (1,3%) (Giani *et al.*, 2013).

Já na América do Sul, a disseminação endêmica de KPCs foi relatada na Colômbia, Brasil e Argentina. Em relação, ao Brasil, foram isolados produtores de KPC-2, inicialmente relatados nas cidades de Recife, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre (GOMEZ *et al.*, 2011; FEHLBERG *et al.*, 2012; ROJAS *et al.*, 2013).

Na Grécia, *K. pneumoniae* produtora de KPC foi isolada pela primeira vez em agosto de 2007, e a prevalência de produtores de KPC entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase coletados em hospital grego aumentou de 0% em 2003 para 38,3% em 2010. A maioria das *K. pneumoniae* produtoras de KPC genotipadas na Grécia abrigavam a enzima KPC-2. Enquanto muitas linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase nos EUA tinham enzimas KPC (ZAGORIANOU *et al.*, 2012; PALACIOS-BAENA *et al.*, 2016).

A propagação esporádica de *K. pneumoniae* produtora de KPC também foi observada em muitos países europeus, incluindo Espanha, França, Alemanha, Holanda, Reino Unido, Irlanda, Bélgica, Suécia e Finlândia, e em vários países da região Ásia-Pacífico, incluindo Índia, Coreia do Sul e Austrália (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; NORDMANN e POIREL, 2014).

Nos países ocidentais, em humanos saudáveis da comunidade, as prevalências de *K. pneumoniae* na colonização do cólon variou de 5 a 35% (MARTIN *et al.*, 2016; GORRIE *et al.*, 2017). Nos países da Ásia, as taxas de colonização por *K. pneumoniae* nas fezes de adultos saudáveis foram 87,7%, 61,1%, 75%, 58,8%, 57,9%, 18,8%, 52,9% e 41,3% para a Malásia, Cingapura, Taiwan, Hong Kong, China, Japão, Tailândia e Vietnã, respectivamente (LIN *et al.*, 2012). Outro estudo realizado na Coreia relatou uma taxa de colonização por *K. pneumoniae* nas fezes de 21,1% (CHUNG *et al.*, 2012).

Em países do ocidente, 1 a 5% dos humanos saudáveis da comunidade são colonizados nasofaríngeos por *K. pneumoniae*. No Brasil e Vietnã crianças de 10 anos de idade tiveram colonização nasofaríngea por *K. pneumoniae* de 1,4% (17 / 1.192) e 1,6%, respectivamente. Em contraste, 7% das crianças indonésias (16/243) foram colonizadas por *K. pneumoniae*. As taxas de colonização nasofaríngea aumentam com a idade; na Indonésia, 15% dos adultos (38/253) foram colonizados por *K. pneumoniae* na nasofaringe e no Vietnã a taxa de colonização geral foi de 14,7%, mas ultrapassou 20% nos 40 anos de idade (LIMA; LEAO; PIMENTA, 2010; DAO *et al.*, 2014; FARIDA *et al.*, 2013).

A taxas aumentadas de colonização nasofaríngea foram associadas a condições mais precárias de saneamento e maior contaminação de alimentos e água, idade, tabagismo, uso de álcool e viver em uma comunidade rural (DAO *et al.*, 2014; FARIDA *et al.*, 2013).

Estudos realizados na Espanha mostraram que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase abrigou OXA-48-like ou classe B carbapenemases, e a taxa de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi muito baixa (2–3%) (PALACIOS-BAENA *et al.*, 2016).

A coexistência de KPCs e de outros tipos carbapenemases em *K. pneumoniae* foi freqüentemente relatada em todo o mundo, incluindo na Itália (KPC-3 / VIM-2 e KPC-2 / VIM-1), Colômbia (KPC-2 / VIM-24), Brasil (KPC-2 / NDM-1), China (KPC-2 / NDM-1, KPC-2 / CMY-2 e KPC-2 / IMP-4), Canadá (KPC-3 / CMY-2), e Grécia (KPC-2 / VIM-1), indicando a prevalência mundial de *K. pneumoniae* co-abrigando duas carbapenemases (LEE *et al.*, 2016).

I.1.7. Uso de animais nas pesquisas científicas

As interações patógeno-hospedeiro podem ser estudadas em muitos níveis, dado que nem todas as interações levam a doenças e aquelas que têm uma progressão complexa que leva a esse estado. A compreensão desses mecanismos de interação patógeno-hospedeiro permite um maior conhecimento sobre doenças associadas aos microrganismos, de modo que os aspectos patofisiológicos das infecções e os fatores de virulência envolvidos podem ser entendidos, sendo possível empregar alvos terapêuticos (MARSH e MAY, 2012; ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

Os modelos murinos são amplamente utilizados para esses estudos devido à sua similaridade fisiológica e imunológica com o homem. Entretanto, problemas éticos e logísticos associados ao uso de camundongos na experimentação tem causado lentidão na pesquisa acerca dos microrganismos patogênicos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

Devido às crescentes preocupações com o bem-estar dos animais sencientes na pesquisa científica e aos esforços para diminuir o uso desses modelos de hospedeiro clássicos em determinados experimentos, existe uma necessidade maior de encontrar organismos nos quais estudar tais interações eticamente e em larga escala (MARSH e MAY, 2012; GYSSENS, 2019).

Dessa forma, a descoberta de um número de organismos modelos simples e geneticamente tratáveis como *Acanthamoeba castellanii*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, zebrafish (*Danio rerio*), *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* e mais recentemente *Pristionchus pacificus*, podem diminuir o uso dos modelos tradicionais utilizados

em estudos laboratoriais (MYLONAKIS *et al.*, 2002; TREDE *et al.*, 2004; FERRANDON *et al.*, 2007; DA SILVA, 2005- 2013; CORSI; WIGHTMAN e CHALFIE, 2015). *C. elegans* e *P. pacificus* foram os modelos escolhidos para serem hospedeiros alternativos no presente estudo, portanto, serão abordados com mais profundidade nos tópicos abaixo.

I.1.8. *Caenorhabditis elegans*

Em 1963, Sidney Brenner introduziu em seu laboratório o nematódeo *C. elegans* como um organismo modelo para investigação e compreensão de questões relacionadas com a biologia do desenvolvimento e neurobiologia. Desde então, *C. elegans* tem sido amplamente utilizado como organismo modelo para os mais diversos tipos de pesquisa como por exemplo, interações parasito-hospedeiro, toxicologia e evolução, obesidade e regulação do metabolismo de gordura, doenças neurodegenerativas e câncer (RIDDLE *et al.*, 1997; ASHRAFI, 2007; KATO e SLACK, 2008; AVILA; HELMCKE; ASCHNER, 2012; CORSI *et al.*, 2015).

De acordo com Mylonakis (2005), os modelos de invertebrados como o *C. elegans* oferecem uma série de vantagens em relação aos modelos vertebrados de ratos e camundongos, como o menor tamanho do animal (1,5 mm quando adulto), ciclo de vida rápido com 3 dias a 25 ° de ovo a adulto e postura de ovos, a redução de custo na criação, rapidez nos resultados e não há necessidade da aprovação da pesquisa pelo comitê de ética. Além disso, podem ser utilizados para estudos em grande escala, servindo como triagem para os estudos em vertebrados.

Outra vantagem de *C. elegans*, é a existência de informações do seu genoma que foi completamente sequenciado, portanto, é possível a utilização de várias técnicas de análise genética e molecular (C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Além disso, apresenta cerca de 20.444 genes codificadores de proteínas, 60 a 80% desses possuem similaridade com os genes humanos, sendo que 40% desses genes conservados estão relacionados a doenças humanas e às vias de infecção (KALETTA E HENGARTNER, 2006). E recentemente, *C. elegans* teve o seu conectoma sequenciado (COOK *et al.*, 2019).

Segundo Corsi *et al.* (2015), *C. elegans* é um animal transparente, que proporciona aos pesquisadores a oportunidade de observar as células no curso do desenvolvimento, e caracterizam-se por serem espécies que reproduzem rapidamente e prolificamente, podendo ser facilmente criados em placas de ágar NGM (Nematode Growth Medium) contendo uma camada

de bactérias *Escherichia coli* (OP50) como alimento. Em condições ótimas, o ciclo de vida é completado em apenas três dias.

Muitas são as vantagens experimentais que tornam o *C. elegans* um modelo animal bem-sucedido e entre elas a sua grande capacidade reprodutiva (NAYAK *et al.*, 2004). A população de *C. elegans* é dominada por auto-fertilização hermafrodita (XX) com uma rara ocorrência de machos (X0), uma frequência menor que 0,2 % são do sexo masculino, que apresentam uma morfologia distinta (Figura 8) (BRENNER, 1974).

Os hermafroditas podem produzir até 300 auto-progênie que são fertilizados pelo esperma armazenado, e se acasaladas com machos, essas são capazes de produzir ~1000 proles, indicando que o esperma produzido em hermafrodita é um fator limitante na auto-fecundação (ZARKOWER, 2006). Embora raramente sejam produzidos, os machos oferecem oportunidades para a construção de novos estoques genéticos por cruzamentos com um hermafrodita (COX, DOUDNA e O'DONNELL, 2012).

O hermafrodita grávido expele os ovos, o qual, após a eclosão, passa por quatro estágios larvais de L1 a L4, até chegar à fase adulta (Figura 2). As larvas recém-nascidas medem cerca de 0,25 milímetros de comprimento, e começam a se alimentar e desenvolver a partir do estágio L1 (GAVA, 2013; CORSI *et al.*, 2015).

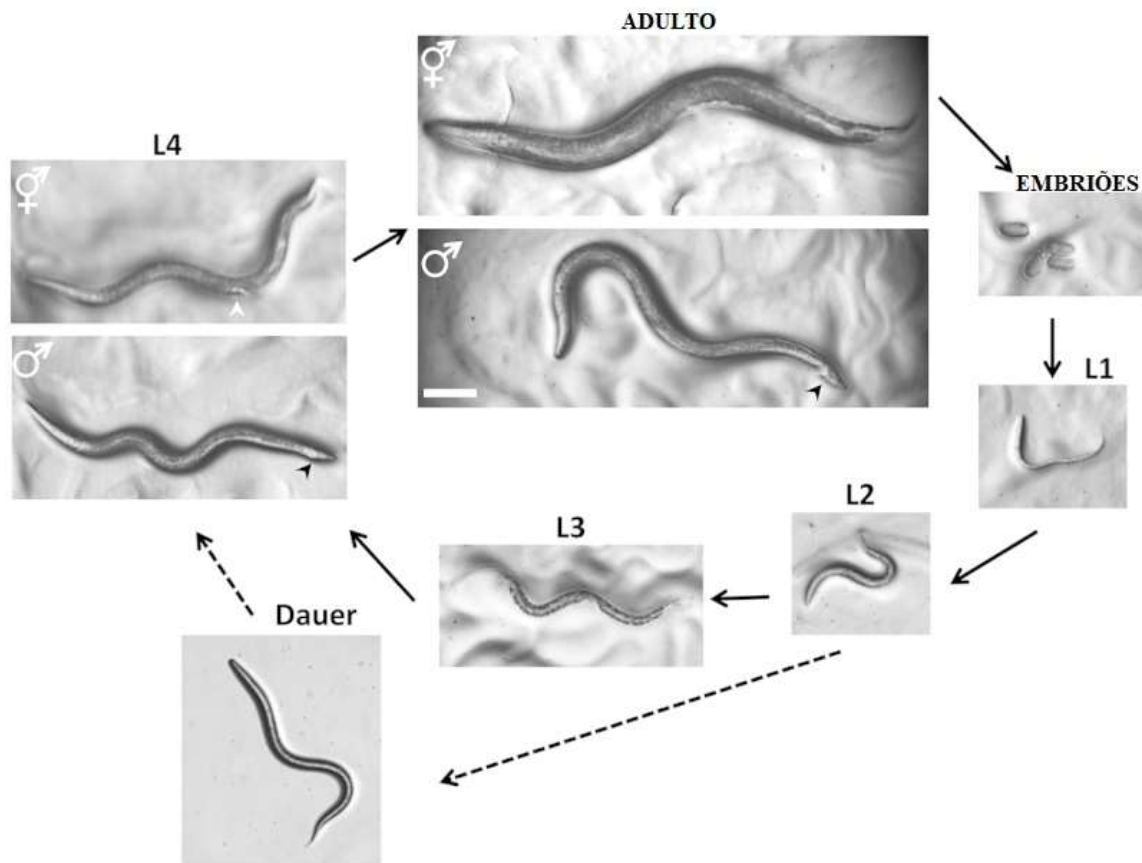


Figura 2: Ciclo de vida de *C. elegans*. Os animais aumentam de tamanho ao longo dos quatro estágios larvais, mas os sexos individuais não são facilmente distinguidos até o estágio L4. No estágio L4, os hermafroditas têm uma cauda afilada e a vulva em desenvolvimento (ponta de seta branca) pode ser vista como um semicírculo claro no centro do lado ventral. Os machos têm uma cauda mais larga (ponta de seta preta), mas nenhum leque perceptível neste estágio. Em adultos, os dois sexos podem ser distinguidos pela circunferência mais larga e cauda cônica do hermafrodita e circunferência mais fina e cauda em forma de leque (ponta de seta preta) do macho. Os oócitos podem ser fertilizados pelo esperma do hermafrodita ou pelo esperma obtido dos machos através do acasalamento. As larvas dauer são mais magras do que todos os outros estágios larvais. Adaptado de Corsi, Wightman, Chalfie (2015).

Os hermafroditas adultos começam a produzir progênie por um período de 23 dias até se ter utilizado o seu esperma autoproduzidos e após o período reprodutivo, hermafroditas podem viver várias semanas antes de morrer de senescência (CORSI *et al.*, 2015).

Além das mudanças de fases L1 a L4, existe a fase de larva dauer a qual se caracteriza como um estágio de desenvolvimento alternativo, especializado na sobrevivência a longo prazo e uma forma de dispersão desse animal na natureza. Esse ciclo de vida é ativado quando o animal se encontra em condições externas adversas, como por exemplo, a escassez de alimento,

desse modo, o animal na fase L2 muda para L2d (L2 dauer) uma forma alternativa a fase L3 (LEE *et al.* 2012; HU, 2007). A cutícula da larva dauer circunda completamente o animal e conecta a boca impedindo que o nematódeo alimente-se, desse modo, prendendo o desenvolvimento da larva em L2d. Esse processo oferece maior resistência a produtos químicos, estresses ambientais e agentes cáusticos (CORSI *et al.*, 2015).

De acordo com Rhoads *et al.*, (2006), o modelo experimental *C. elegans* tem muitas características de eucariotas superiores como tecidos, órgãos, músculos, um sistema nervoso e estágios de desenvolvimento, que envolvem processos regulados ao nível da tradução. Além disso, as vias de sinalização que conduzem à síntese de proteínas são consideravelmente mais semelhantes entre *C. elegans* e humanos. Isto permite que os investigadores de síntese de proteínas possam combinar bioquímica, biologia celular, genética e outras áreas do conhecimento para estudar a regulação da expressão do gene ao nível da tradução.

Nos últimos anos, os pesquisadores começaram a utilizar *C. elegans* como modelo para estudos *in vivo*, a fim de investigar a biologia de agentes patogênicos humanos, principalmente fungos e bactérias (POWELL e AUSUBEL, 2008; MARSH e MAY, 2012; HUANG *et al.*, 2014). O estudo de interação patógeno-hospedeiro utilizando *C. elegans* proporcionou a avaliação da patogenicidade e fatores de virulência de vários microrganismos, como por exemplo, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, entre outros (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

Uma grande variedade de patógenos bacterianos, bem como vários fungos, matam *C. elegans* ou produzem sintomas de doenças não letais. Isso permite que o nematódeo seja usado como um modelo de hospedeiro simples e tratável para doenças infecciosas (DARBY, 2005).

Os vários mecanismos de virulência usados por patógenos para causar doenças em seres humanos demonstraram ser importantes para a doença em *C. elegans*, incluindo infecção persistente do intestino, colonização com formação de biofilme na cutícula do verme e morte por toxinas como a toxina botulínica, cianeto de hidrogênio ou peróxido de hidrogênio (DARBY, 2005; KALETTA ; HENGARTNER, 2006). Acredita-se que muitos desses mecanismos microbianos responsáveis por causar em doenças infecciosas em humanos, sejam adaptações de caminhos que primeiro evoluíram como defesas contra nemátódeos (DARBY, 2005).

O alto grau de sobreposição entre os fatores de virulência necessários para a patogênese em nemátódeos e humanos, valida o uso de *C. elegans* como um modelo hospedeiro substituto

(KALETTA ; HENGARTNER, 2006). Além disso, há uma extensa coleção de mutantes de *C. elegans* disponíveis o que possibilita entender melhor os mecanismos de patogênese e a resposta do hospedeiro (DARBY, 2005).

Nos experimentos, para dar início a infecção, *C. elegans* é adicionado sobre a camada de patógeno, seja bactéria ou fungo, quando encontram-se no estágio L4. A transparência de *C. elegans* permite a observação direta dos organismos infecciosos dentro do verme por microscopia de contraste com interferência diferencial (DIC); isso é facilitado pelo uso de patógenos transformados para expressar a proteína verde fluorescente denominada de GFP (DARBY, 2005; CORSI; WIGHTMAN; e CHALFIE, 2015).

A interação de *C. elegans* com os patógenos ocorre pela faringe, através da alimentação, e também na epiderme e no intestino. O controle das infecções ocorre pelo sistema imune inato através da liberação de moléculas com ação antimicrobiana, como lecitinas, lisozimas e peptídeos antimicrobianos. Em relação a mortalidade, é geralmente relatada com o tempo para 50% dos animais morrerem (LT50) (KALETTA; HENGARTNER, 2006; MARSH; MAY, 2012).

I.1.9. *Pristionchus pacificus*

O nemátodeo *P. pacificus* foi descrito como uma nova espécie em 1996 e o primeiro isolado PS312 de Pasadena, uma cidade do estado da Califórnia (SOMMER *et al.*, 1996; SOMMER E STERNBERG, 1996). No entanto, foi recentemente estabelecido como um novo sistema de modelo genético para estudos da biologia evolutiva integrativa e comparativa (PIRES-DASILVA, 2013; WILECKI *et al.*, 2015).

P. pacificus é um parente próximo do rhabditídeo *C. elegans*, porém pertencente à família Diplogastridae e apresenta uma morfologia corporal distinta e diverge tanto no desenvolvimento quanto ao nível celular e molecular quando comparado ao *C. elegans*. Apesar dessas diferenças, compartilha muitas características com *C. elegans* que são vantajosas para análises genéticas como pequeno tamanho de genoma (169 Mb), pequeno número de cromossomos (conjunto haplóide com 5 autossomos e 1 cromossomo sexual), é hermafrodita, pode ser cultivado em placas contendo uma camada da bactéria *E. coli* OP50, ciclo de vida curto (4 dias a 20 ° C) e produz grandes tamanhos de progênie (120-180 ovos). Além disso, da mesma forma que *C. elegans*, *P. pacificus* possui 4 estágios de larvais (L1-L4). No entanto, as espécies da família Diplogastridae tem uma muda embrionária, no qual as larvas L1 mudam

para L2 antes de eclodirem do ovo. Assim, o estágio L1 não é de vida livre nem de alimentação (SUDHAUS e FÜRST VON LIEVEN, 2003; PIRES-DASILVA, 2005-2013; DIETERICH *et al.*, 2008; AKDUMAN, RÖDELSPERGER e SOMMER, 2018).

P. pacificus e *C. elegans* são hermafroditas autofertilizantes, no entanto, há uma ocorrência freqüente de machos na população de *P. pacificus*, ao contrário da população de *C. elegans* que apresenta uma ocorrência de 0,2% de machos (HONG e SOMMER, 2006).

Na natureza, *P. pacificus* é encontrado em associação com besouros no estado de dormência conhecido como “dauer” e quando os besouros morrem, *P. pacificus* sai desse estado para se alimentar de bactérias que participam do processo de decomposição e prossegue para a maturidade reprodutiva (WERNER *et al.*, 2017). Especificamente, *P. pacificus* pode ser encontrado em associação com diferentes besouros na Ásia e na América do Norte e sua distribuição é influenciada pela invasão de espécies de besouros pelos continentes. Na ilha de La Réunion, o endêmico besouro rinoceronte *Oryctes borbonicus* (Figura 3) representa um sistema de estudo interessante porque mais de 90% dos indivíduos de besouros abrigam larvas dauer de *P. pacificus* (MEYER *et al.*, 2017).

O nematódeo *P. pacificus* vem sendo utilizado como modelo alternativo em muitos estudos de infecção, principalmente em estudos comparativos com *C. elegans* (RAE *et al.*, 2008; SINHA, RAE, SOMMER, 2012; RAE *et al.*, 2012a; RAE *et al.*, 2012b; IATSENKO; NIKOLOV; SOMMER, 2014). Rae e colaboradores (2008), investigaram as interações bactéria-nematódeo utilizando espécies do gênero *Pristionchus*. Foram isoladas vinte e três linhagens bacterianas diferentes (*Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) de três associações de *Pristionchus*-besouro, sob condições controladas de laboratório. Nos estudos de Sinha e colaboradores (2012), foi adotado uma abordagem de biologia de sistemas e uso de microarrays de genoma inteiro para traçar o perfil da resposta transcricional de *C. elegans* e do nematódeo necromênico *P. pacificus* após a exposição a quatro patógenos diferentes como *Serratia marcescens*, *Xenorhabdus nematophila*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus thuringiensis* DB27.

De acordo com Rae e colaboradores (2012), a remoção do sistema reprodutor em *C. elegans*, aumenta a longevidade e proporciona a resistência deste nematódeo a estressores ambientais, como por exemplo, a alimentação de patógenos bacterianos. Para estudar esses aspectos em *P. pacificus*, eles realizaram a ablação de células precursoras da linha germinativa e subsequente alimentação com o patógeno *Serratia marcescens*. Desse modo, descobriram que

P. pacificus mostra uma notável resistência a patógenos bacterianos e que essa resposta é evolutivamente conservada em todo o gênero *Pristionchus*.

Em outro estudo de Rae e colaboradores (2012), foram isoladas 400 linhagens de *Bacillus* de amostras de solo e seus esporos foram usados para alimentar *C. elegans* e *P. pacificus*. Os esporos de seis linhagens de *Bacillus* provocaram a morte de *C. elegans*, mas não de *P. pacificus*. Posteriormente, usaram uma linhagem virulenta de *Bacillus* sp. 142 para realizar uma triagem de mutantes de *P. pacificus* hipersusceptíveis, com defeitos musculares graves e um ciclo de defecação prolongado. Os nematódeos hipersusceptíveis de *P. pacificus* morreram rapidamente quando alimentados com esporos de *Bacillus* sp. 142.

Iatsenko e colaboradores (2014), para estudar os fatores de virulência da linhagem de *Bacillus thuringiensis* 4A4, utilizaram *C. elegans* e *P. pacificus* como modelos alternativos. Os resultados mostraram que *B. thuringiensis* 4A4 mata ambos os nematódeos por meio de lesão intestinal. Os cristais purificados de β -exotoxina de *B. thuringiensis* 4A4 também não intoxicaram *P. pacificus*, assim como a mistura de esporos-cristal autoclavados, sugerindo que a β -exotoxina primária é responsável pela morte de *C. elegans* e *P. pacificus*.

II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As infecções relacionadas a assistência a saúde são um fator preocupante em todo mundo devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, sendo consideradas como um problema de saúde pública. Essas IRAS podem ser causadas por diferentes grupos de microrganismos como bactérias, fungos e vírus. Entretanto, as bactérias representam os principais patógenos nosocomiais, causando infecções principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

O ambiente hospitalar expõe os seus ocupantes a vários patógenos bacterianos resistentes aos antimicrobianos disponíveis e até mesmo aqueles com amplo espectro de ação, especialmente em pacientes gravemente doentes que fazem o uso de dispositivos médicos invasivos, aqueles com doenças subjacentes e/ou internados em UTIs.

Os patógenos de grande relevância clínica e que têm causado a maior parte das infecções tanto em hospitais de países desenvolvidos quanto em hospitais de países em desenvolvimento

foram resumidos pela sigla “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp.*). Este grupo representa o maior desafio no tratamento das infecções nosocomiais devido aos numerosos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de uso clínico, patogênese e transmissão.

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo responsável por diferentes tipos de infecções como septicemias, infecções urinárias, meningites e pneumonias, principalmente em pacientes imunocomprometidos. É considerado um patógeno oportunista de grande importância nas infecções relacionadas à assistência à saúde, pois é capaz de adquirir resistência a antimicrobianos, como por exemplo, os antimicrobianos Carbapenêmicos, além de apresentar habilidade de transmissibilidade horizontal de genes de resistência para espécies do mesmo gênero ou gêneros diferentes de bactérias.

Outro exemplo de patógeno oportunista Gram-negativo é *K. pneumoniae*, um agente causador de uma série de infecções graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como pneumonia, sepse, bacteremia, meningite e abscessos hepáticos piogênicos. Além disso, é considerado como um dos patógenos de grande relevância clínica no mundo devido a sua alta capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos, incluindo os mais potentes, como por exemplo, os carbapenêmicos. Desse modo há uma crescente escassez de tratamentos eficazes contra as infecções causadas por *K. pneumoniae*.

Dessa forma, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de mais estudos sobre as interações microrganismo-hospedeiro, bem como estudos sobre os aspectos da patogênese e sua relação com amostras bacterianas multirresistentes a antimicrobianos.

Caenorhabditis elegans é modelo alternativo invertebrado que apresenta uma ampla aplicação na pesquisa, e desta forma auxilia na investigação de vários aspectos da patogenicidade de diversos agentes infecciosos humanos, incluindo bactérias de relevância clínica.

Em relação à *Pristichionus pacificus*, há estudos que usam este nematódeo como modelo comparativo com *C. elegans*, em estudos relacionados aos mecanismos de patogenicidade de agentes bacterianos (RAE *et al.*, 2008; SINHA, RAE, SOMMER, 2012; RAE *et al.*, 2012a; RAE *et al.*, 2012b; IATSENKO; NIKOLOV; SOMMER, 2014).

Considerando-se o exposto, o presente trabalho visa contribuir para o entendimento da patogenicidade de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, com fenótipo de resistência a antimicrobianos, nos modelos invertebrados alternativos *C. elegans* e *P. pacificus*, a fim de

verificar uma possível correlação entre o perfil de resistência das amostras bacterianas avaliadas e o aumento de mortalidade dos modelos *C. elegans* e *P. pacificus*.

III.1 - OBJETIVOS

III.1.1. Objetivo Geral

Avaliar a patogenicidade de *K. pneumoniae* ATCC 13883 e amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC); e, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e amostras clínicas de *A. baumannii* multidrogarresistentes (MDR) em *Caenorhabditis elegans* e *Pritichiocus pacificus*.

III.1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar a sobrevivência de *C. elegans* e *P. pacificus* após a infecção com os patógenos *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, em comparação as amostras ATCC.
- Correlacionar à resistência dos patógenos *A. baumannii* e *K. pneumoniae* a antimicrobianos com a sua letalidade para os modelos invertebrados.

IV.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1.1. Cultivo e manutenção dos microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606 e amostras clínicas de *A. baumannii* MDR) assim como, uma amostra de referência de *K. pneumoniae* (ATCC 13883) e amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC). As amostras clínicas das respectivas bactérias fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Para os ensaios, uma colônia isolada de cada bactéria foi crescida em BHI (Brain Heart Infusion – marca Kasvi), e incubadas a 37°C sob agitação, overnight. Posteriormente, plaqueadas em BHI ágar e incubadas a 37° C por 48 horas. Após esse período, foi feito um estoque de trabalho, no qual uma colônia de cada bactéria foi adicionada em criotubos contendo a solução de congelamento (BHI e glicerol a 80%) e estes foram armazenados à -80°C.

Tabela 1. Informações sobre as amostras clínicas de *A. baumannii*

Identificação	Sítios infecciosos	Genes de patogenicidade
05	Aspirado traqueal	Todos os genes*
06	Hemocultura	<i>luxI</i> , <i>luxR</i> , <i>bap</i> , <i>wzc</i> e <i>gaiU</i>
17	Aspirado traqueal	<i>Omp33</i> , <i>luxI</i> , <i>luxR</i> , <i>bap</i> , <i>wzc</i> e <i>gaiU</i>
18	Hemocultura	<i>luxI</i> , <i>luxR</i> , <i>bap</i> , <i>wzc</i> e <i>gaiU</i>
21	Hemocultura	Todos os genes*
25	Ferida operatória	<i>luxI</i> , <i>luxR</i> , <i>bap</i> e <i>gaiU</i>
26	Ponta de cateter	<i>luxI</i> , <i>luxR</i> , <i>bap</i> , <i>wzc</i> e <i>gaiU</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

* Presença dos genes *OmpA*, *Omp33*, *luxI*, *luxR*, *bap*, *wzc* e *gaiU*.

Tabela 2. Informações sobre as amostras clínicas de *K. pneumoniae*

Identificação	Sítios infecciosos	Genes de patogenicidade
U4	Urina	<i>bla_{KPC}</i>
U10	Urina	<i>bla_{KPC}</i>
U14	Urina	<i>bla_{KPC}</i>
V11	Swab de vigilância	<i>bla_{KPC}</i>
P5	Ponta de cateter	<i>bla_{KPC}</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

bla_{KPC} - principal gene codificante de betalactamase relacionado à resistência aos carbapenêmicos em amostras de *K. pneumoniae*.

IV.1.2. Padronização dos inóculos bacterianos

Cada amostra de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* foram reativada em 2mL de BHI líquido em tubos de ensaio em vidro de 14 mL, e foram incubadas a 37°C por 24 horas. Inicialmente, os inóculos de cada bactéria foram padronizados através da utilização de uma escala 0,5 McFarland para obter uma turvação com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, a fim de obter medidas mais acuradas dos inóculos, utilizou-se espectrofotômetro (Shimadzu, CPS 240-A, Kyoto, Japão) com densidade ótica de 600 nm para chegar a uma absorbância de 0,08 a 0,1.

IV.1.3. Cultivo e manutenção dos modelos invertebrados alternativos

Foram utilizados como modelos de infecção para os ensaios *in vivo*, a linhagem N2 (Selvagem) de *C. elegans* (BRENNER, 1974). e a linhagem PS312 de *Pristichionus pacificus*, gentilmente cedidas pelo CGC (*Caenorhabditis* Genetics Center).

Os vermes foram mantidos em placas contendo o meio NGM (“Nematode Growth Media”) sólido, composto por NaCl – 3,0 g; peptona – 2,5 g; K₃PO₄; MgSO₄ – 1M; CaCl₂ e colesterol 5mg/mL, com a alimentação normal de *Escherichia coli* OP50 a temperatura de 16°C (STIERNAGLE, 2006), utilizando metodologia padrão utilizado por todos os laboratórios credenciados pelo wormbase, como o LBCM (Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos)

IV.1.4. Sincronização de *C. elegans* e *P. pacificus*

Para os experimentos, os nematódeos foram sincronizados utilizando método padrão descrito na literatura (PORTA DE LA RIVA *et. al.*, 2012), no qual verme adultos *C. elegans* grávidos e/ou ovos foram coletados em tampão M9 (KH₂PO₄ – 3,0 g; Na₂PO₄ 6,0 g; NaCl 5,0 g e MgSO₄ 1M para 1 litro de água destilada e autoclavada), lavados com o mesmo tampão, e posteriormente lisados com 1mL da solução de sincronização (2,5 mL de NaOH 1M, 1 mL e hipoclorito de sódio a 3%).

Após a dissolução dos adultos e liberação de ovos, a reação é neutralizada com adição de tampão M9 e três lavagens subsequentes. Os ovos obtidos foram incubados por 18 a 24h em tampão M9, sob agitação, a 16°C. Posteriormente, os nematódeos no estágio L1 foram adicionados à placas contendo NGM e *E. coli* OP50, e incubados até chegarem no estágio larval L4 (adulto jovem) a 16 ou 25°C (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012).

Para *P. pacificus*, o processo de sincronização foi realizado utilizando mesmo protocolo descrito para *C. elegans*, porém o estágio obtido após a incubação é a L2 visto que este nematodeo passa de L1 a L2 ainda dentro dos ovos (SUDHAUS e FÜRST VON LIEVEN, 2003; PIRES-DASILVA, 2005-2013),

IV.1.5. Ensaios de sobrevivência

Para iniciar os ensaios de infecção, 200µL do inóculo de cada bactéria foi adicionado em placas médias (49x13mm) contendo BHI ágar. Foi adicionado 40 nematódeos em cada placa, que posteriormente foram incubadas durante 4 horas em BOD a 25 °C.

Após esse período, as placas contendo os nematódeos foram lavadas separadamente quatro vezes com tampão M9 para retirar o excesso de bactérias presente na cutícula dos nematódeos, e ao final da lavagem cada falcon de 15mL ficou com um volume de 2 mL contendo o pellet de nematódeos. Posteriormente, o volume foi resuspenso e 20 µL de cada falcon foram inoculados em lâmina de vidro escavada e os nematódeos presentes foram quantificados até tivesse 10 nematódeos por poço.

Foram inoculados 20µL contendo 10 nematódeos em estágio L4 (adulto jovem), em placas de cultura (tamanho 35mm x 10 mm) contendo o meio NGM, 20 µL de *E. coli* OP50 e 4µL de Nystatina e 5µL de FUdR (Floxuridina) 50 µg/mL (um inibidor de timidilato sintase para impedir a produção de descendência em *C. elegans* e *P. pacificus*, que não interfere no

desenvolvimento e envelhecimento pós-maturacional). As placas foram incubadas em BOD de 25 °C e a contagem dos nematódeos vivos foram realizadas através de um estímulo mecânico a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos.

A experimentação *in vivo* foi constituída de dois grupos: **1-** controle contendo uma camada da bactéria *E. coli* OP50 em meio NGM, 4µL de Nystatina, 5µL de FUdR (Flozuridina) 50 µg/mL e 10 nematódeos em estágio L4; **2-** placas dos grupos de infecção contendo uma camada da bactéria *E. coli* OP50 em meio NGM, 4µL de Nystatina, 5µL de FUdR (Flozuridina) 50 µg/mL e 10 nematódeos em estágio L4 infectados anteriormente de forma aguda.

IV.1.6. Análises estatística

As curvas de sobrevivência foram construídas pela contabilização de indivíduos vivos a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos. Dessa forma, pode-se calcular o tempo necessário para a morte de 50% da população de *C. elegans* e *P. pacificus* (LT50). A estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank e Wilcoxon por Kaplan-Meyer utilizando o software GraphPrism, versão 5.01. O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Cada ensaio foi realizado com duas réplicas técnicas e duas réplicas biológicas independentes.

V.1. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca 40% dos genes conhecidos associados a doenças humanas têm ortólogos claros no genoma de *C. elegans*, portanto, isso permite que o nematódeo seja usado como um modelo de hospedeiro simples e tratável para os estudos da patogênese. A maioria dos patógenos investigados colonizam o intestino de *C. elegans*, e a patologia é geralmente quantificada como a diminuição da expectativa de vida do nematódeo. O modelo alternativo *C. elegans*, quando em condições ideais, tem um ciclo de vida que se encerra entre 22 e 30 dias a 25°C (DARBY, 2005; KALETTA, HENGARTNE, 2006).

Nas últimas décadas, o nematódeo *P. pacificus* foi estabelecido como um organismo modelo satélite para o amplamente conhecido *C. elegans* para estudos comparativos envolvendo biologia do desenvolvimento, neurociência, imunidade, bem como genômica comparativa e populacional (LIGHTFOOT *et al.*, 2016). Além disso, existem estudos que utilizam *P. pacificus* como modelo alternativo para análise da patogenicidade de bactérias que causam doenças em insetos e em humanos (RAE *et al.*, 2008-2012).

No presente trabalho, inicialmente, foram realizados os testes de sobrevivência para observar a taxa de mortalidade de *C. elegans* e *P. pacificus* quando infectados com os microrganismos em estudo: amostra de referência de *A. baumannii* ATCC 19606, isolados clínicos de *A. baumannii* Ab05, Ab06, Ab17, Ab18, Ab21, Ab25, Ab26; amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883, isolados clínicos de *K. pneumoniae* U4, U10, U14, V11 e P5.

V.1.1. Avaliação da sobrevivência da população de *C. elegans* infectada por *A. baumannii*.

Os Gráfico 1 e 2 representam as curvas de sobrevivência obtidas durante os ensaios de infecção por amostras de *A. baumannii* na população em estágio L4 de *C. elegans*, e a Tabela 3 representa a LT50 das curvas de sobrevivência.

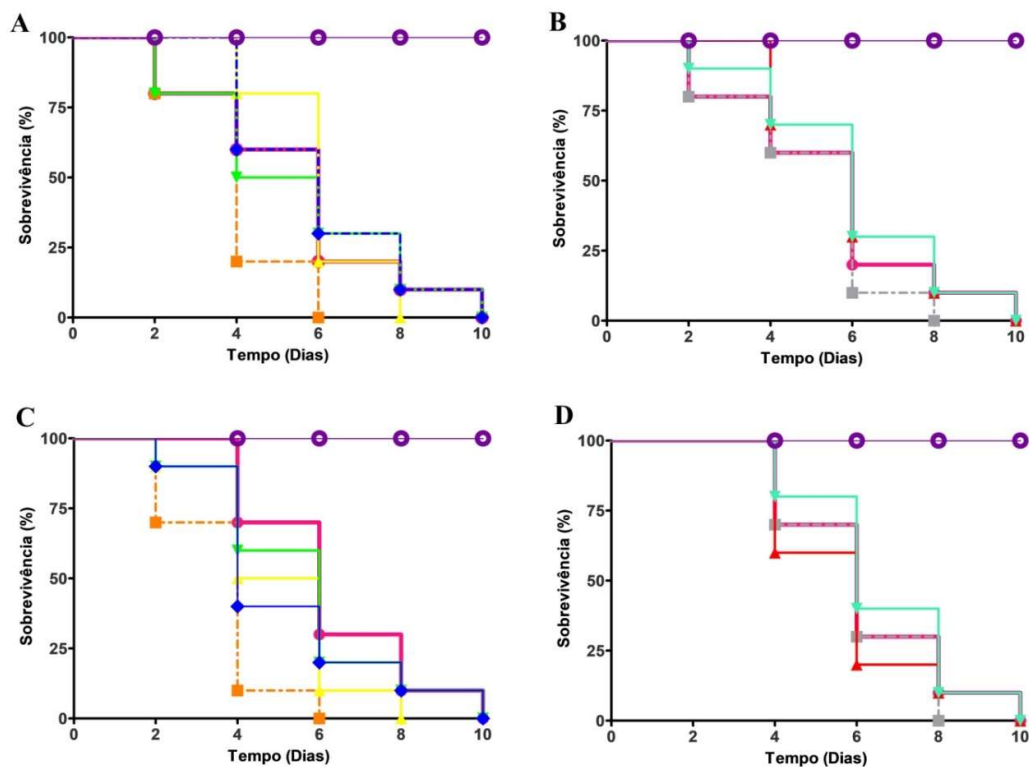


Figura 3. Curvas de sobrevivência de *C. elegans* (N2) infectado com as amostras de *A. baumannii*.

As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *C. elegans* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 10 dias. A população de *C. elegans* infectada com a amostra clínica de *A. baumannii* Ab05 (■) tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 6 dias, quando comparada com a amostra clínica Ab06 (★) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 8 dias, e com a amostra de referência ATCC Ab (●) e as outras amostras clínicas Ab17 (▼), Ab18 (◆), Ab21 (■), Ab25 (▲), e Ab26 (▼) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 10 dias. A população de *C. elegans* incubadas com *E. coli* OP50 (⊖), sua alimentação normal, sobreviveram 20 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

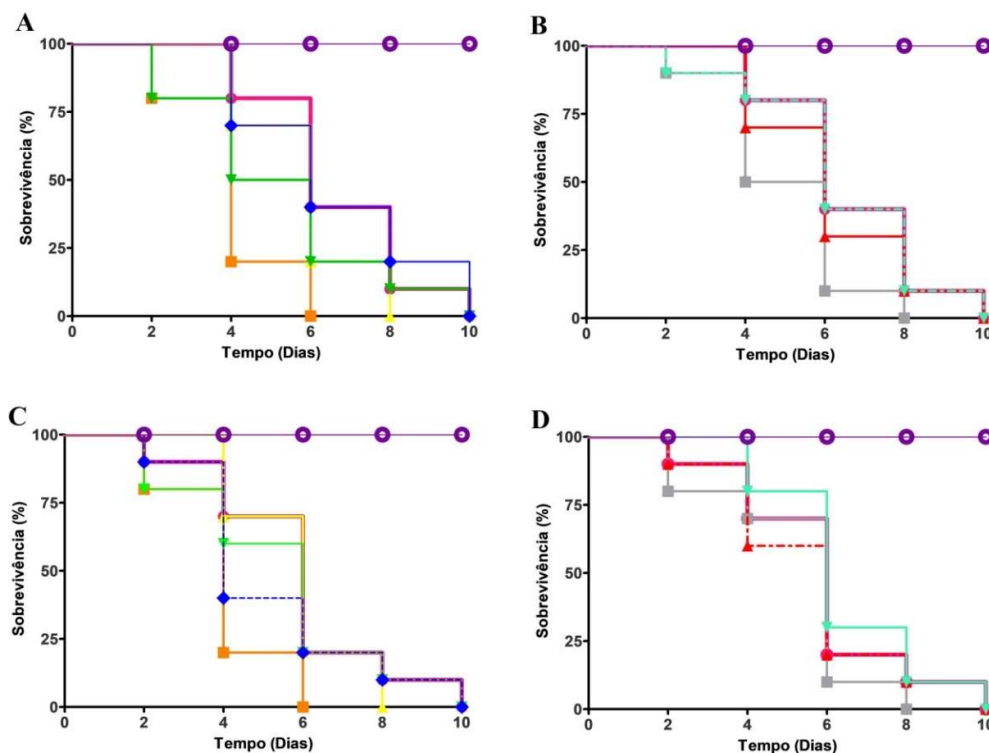


Figura 4. Curvas de sobrevivência de *C. elegans* (N2) infectado com das amostras de *A. baumannii*.

As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *C. elegans* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 10 dias. A população de *C. elegans* infectada com a amostra clínica de *A. baumannii* Ab05 (■) tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 6 dias, quando comparada com a amostra clínica Ab06 (★) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 8 dias, e com a amostra de referência ATCC Ab (●) e as outras amostras clínicas Ab17 (▼), Ab18 (◆), Ab21 (■), Ab25 (▲), e Ab26 (▼) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 10 dias. A população de *C. elegans* incubadas com *E. coli* OP50 (⊕), sua alimentação normal, sobreviveram 20 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

Em ensaios de sobrevivência com *C. elegans*, o ponto mais importante é a LT50, que é o tempo em que 50% da população do verme morre. Nesse trabalho, a população de *C. elegans* (N2) infectada com a amostra clínica de *A. baumannii* Ab05 tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 6 dias (Gráficos 1 e 2), com LT50 em 4 dias (Tabela 3), quando comparada com a amostra de referência de *A. baumannii* ATCC 19606 (ATCC Ab) ($p < 0,05$) e as outras amostras clínicas Ab06, Ab17, Ab18, Ab21, Ab25 e Ab26 ($p < 0,05$). A amostra clínica Ab05

apresentou uma maior patogenicidade tanto em relação à amostra de referência ATCC Ab, quanto em relação às outras amostras clínicas.

Outras amostras clínicas que também promoveram uma menor taxa de sobrevivência da população de *C. elegans* em 8 dias (Gráficos 1 e 2), com uma LT50 de 6 dias (Tabela 3), foram os isolados de *A. baumannii* Ab06 e Ab21, porém não apresentaram diferença significativa em comparação as outras amostras clínicas.

A população de *C. elegans* infectada com a amostra de referência de *A. baumannii* 19606 (ATCC Ab), sobreviveram por 10 dias (Gráficos 1 e 2), com LT50 em 6 dias (Tabela 3). O mesmo resultado foi observado para os nematódeos infectados com os isolados clínicos Ab21, Ab25 e Ab26, com uma sobrevivência de 10 dias (Gráfico 1 e 2) e LT50 em 6 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de *A. baumannii* em *C. elegans* (N2)

LT50 (Dias)			
Experimento 1		Experimento 2	
ATCC Ab	6 dias	ATCC ab	6 dias
Ab05	4 dias	Ab05	4 dias
Ab06	6 dias	Ab06	6 dias
Ab17	5 dias	Ab17	5 dias
Ab18	6 dias	Ab18	6 dias
Ab21	6 dias	Ab21	6 dias
Ab25	6 dias	Ab25	6 dias
Ab26	6 dias	Ab26	6 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de LT50 para a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606 obtido neste estudo, diferem dos valores de LT50 disponíveis na literatura para esta e outras ATCC's, assim como para diferentes linhagens de *A. baumannii* com fenótipos de resistência a antimicrobianos.

Um exemplo é o estudo de Espinal e colaboradores (2019), no qual a LT50 de *A. baumannii* ATCC 19606 foi estatisticamente significativa em relação à linhagem de *A. baumannii* resistente à colistina (LT50 = 8,5 vs. 9,5 - 0,5 dias, respectivamente) ($p = 0,0002$).

Já a LT50 das linhagens resistentes a carbapenêmicos de *A. baumannii* foram semelhantes a LT50 do controle avirulento de *E. coli* OP50. No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre *E. coli* OP50 e isolados que expressavam NDM-2 ($p < 0,0001$) e Omp 33–36 ($p < 0,0001$). Os isolados que expressavam NDM-2 foram mais patogênicos para *C. elegans*, apresentando uma $LT50 = 7 - 0,5$ dias, enquanto que os isolados produtores de OXA-23 e linhagens isogênicas de *A. baumannii* apresentaram uma $LT50 = 8 - 0,5$ dias. Além disso, as curvas de Kaplan-Meier não mostraram nenhuma diferença estatística entre linhagens de *A. baumannii* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos.

Apesar de não apresentarem valores de LT50, os estudos de Vallejo e colaboradores (2015), mostrou que a LT100 das curvas de sobrevivência de *C. elegans* nos ensaios de infecção por ATCC 19606 (baixa virulência), ATCC 17978 (virulência intermediária), *A. baumannii* AB307-0294 (alta virulência) e *E. coli* OP50 (controle) foram 16, 15, 14 e 16 dias, respectivamente.

No estudo de Scott e colaboradores (2019), utilizando três membros Gram-negativos do grupo ESKAPE, foi observado que os perfis de patogenicidade medidos através da análise da sobrevivência de *C. elegans* mostrou que as linhagens de *A. baumannii* ATCC 17978 exibiram a mesma sobrevivência observada em *E. coli* OP50 (morte com 16 dias), ao contrário de *Pseudomonas aeruginosa* foram mais patogênicas (morte em 7 dias), seguidas das linhagens de *K. Pneumoniae* (morte com 10-14 dias).

Já nos estudos de Larcher e colaboradores (2017), a sobrevivência utilizando *C. elegans* como modelo, apresentou uma LT50 de 7 dias para infecções por *Acinetobacter pittii* ST249, 7 dias para *A. baumannii* NAB ST2 e 8 dias para *E. coli* OP50.

V.1.2. Avaliação da sobrevivência da população de *C. elegans* infectada por *K. pneumoniae*

Em relação aos ensaios de infecção com amostras de *K. pneumoniae* e *C. elegans* (N2), os Gráfico 3 e 4 representam as curvas de sobrevivência obtidas durante estes ensaios, e a Tabela 4 representa a LT50 das curvas de sobrevivência.

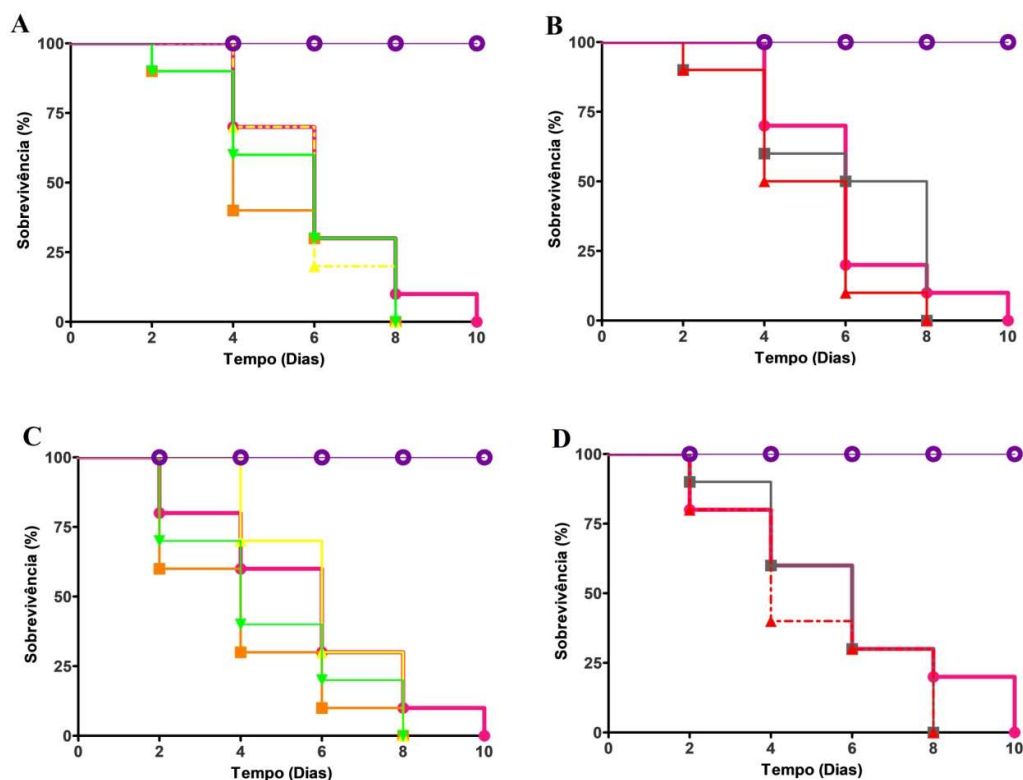


Figura 5. Curvas de sobrevivência de *C. elegans* (N2) infectado com das amostras de *K. pneumoniae*.

As amostras de *K. pneumoniae* foram incubadas com *C. elegans* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 10 dias. A população de *C. elegans* infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U4 (■), U10 (★), U14 (▼), V11 (■) e P5 (▲), tiveram uma menor taxa de sobrevivência, em 8 dias, quando comparado com a amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC Kp (●) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 10 dias. A população de *C. elegans* incubadas com *E. coli* OP50 (●), sua alimentação normal, sobreviveram 20 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

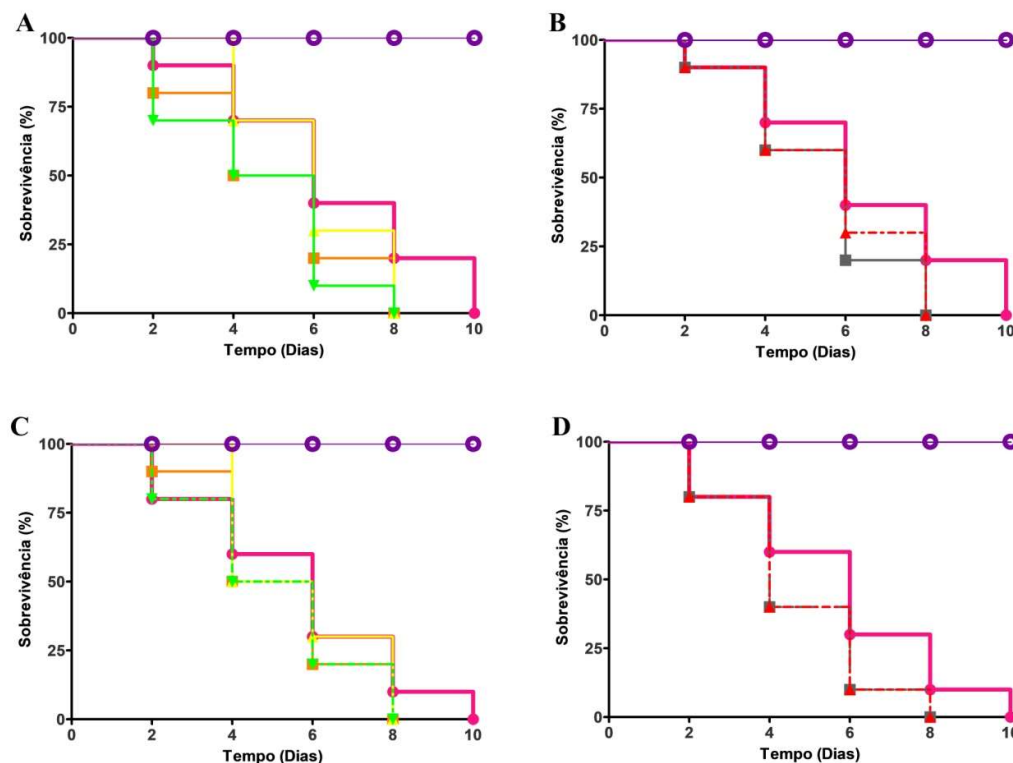


Figura 6. Curvas de sobrevivência de *C. elegans* (N2) infectado com das amostras de *K. pneumoniae*.

As amostras de *K. pneumoniae* foram incubadas com *C. elegans* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 10 dias. A população de *C. elegans* infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U4 (■), U10 (★), U14 (▼), V11 (■) e P5 (▲), tiveram uma menor taxa de sobrevivência, em 8 dias, quando comparado com a amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC Kp (●) ($p < 0,05$), com sobrevivência em 10 dias. A população de *C. elegans* incubadas com *E. coli* OP50 (⊖), sua alimentação normal, sobreviveram 20 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

A população de *C. elegans* (N2) infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U4, U10, U14, V11 e P5, tiveram uma menor taxa de sobrevivência, em 8 dias (Gráficos 3 e 4), apresentando LT_{50} igual a 4, 6, 5, 6 e 5 dias, respectivamente (Tabela 4), quando comparado com a amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883 (ATCC Kp) ($p < 0,05$). As amostras clínicas apresentaram uma patogenicidade maior do que a amostra de referência ATCC Kp. Além disso, dentre as amostras clínicas de *K. pneumoniae*, a amostra U4 apresentou diferença significativa em relação a amostra de referência ATCC Kp ($p < 0,05$) e as amostras clínicas U10 e V11 ($p < 0,05$).

Já a população de *C. elegans* infectada com amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883 (ATCC Kp), tiveram uma sobrevivência de 10 dias (Gráficos 3 e 4), com uma LT50 de 6 dias (Tabela 4).

Tabela 4 - LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de *K. pneumoniae* em *C. elegans* (N2)

LT50 (Dias)			
Experimento 1		Experimento 2	
ATCC Kp	6 dias	ATCC Kp	6 dias
U4	4 dias	U4	4 dias
U10	6 dias	U10	6 dias
U14	5 dias	U14	5 dias
V11	6 dias	V11	6 dias
P5	5 dias	P5	5 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a literatura, um valor de LT50 mais próximo do que foi encontrado neste estudo para *K. pneumoniae* ATCC 13883, foi o do estudo de Bialek-Davenet e colaboradores (2015), onde foi observada uma LT50 de 5 dias para *K. pneumoniae* ATCC 13883 no ensaio de infecção com o modelo alternativo *C. elegans*.

Já em outros estudos, foram encontrados valores de LT50 para diferentes amostras de referência de *K. pneumoniae* e linhagens de *K. pneumoniae* com fenótipos de resistência a antimicrobianos. Um dos exemplos, é o estudo de Bialek e colaboradores (2010), que avaliaram a patogenicidade de *K. pneumoniae* ATCC 138821 e linhagens MDR, e linhagens revertentes e derivadas com expressão alterada de porina sobre a taxa de sobrevivência de *C. elegans*. As linhagens MDR comprovadas ou suspeitas de superexpressarem um sistema de efluxo foram significativamente mais patogênicas do que as linhagens ATCC e revertentes (LT50 em dias: 3,4 a 3,8 0,2 versus 4,1 a 4,4 0,3, P <0,001). Inversamente, as linhagens com expressão alterada de porina foram significativamente menos patogênicas, independentemente do nível de expressão do sistema de efluxo (LT50 em dias: 5,4 a 5,6 0,2, P <0,001).

No estudo de Lavigne e colaboradores (2013), isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC e transformantes foram significativamente menos patogênicos (LT50: 5,5 dias) para a

população de *C. elegans* do que as linhagens *K. pneumoniae* ATCC 10031 e CIP 53153 (LT50: 4,3 dias) ($p < 0,01$). No entanto, as linhagens de *K. pneumoniae* ST258 positivas para KPC-2 e as linhagens de referência contendo plasmídeos extraídos de linhagens de *K. pneumoniae* ST258 tiveram uma patogenicidade mais alta do que as linhagens de KPC-2 pertencentes a outros tipos de ST (LT50: 5 dias vs. 6 dias, $p = 0,01$).

Em um ensaio de morte meio M9 líquido, a gravidade da patogenicidade por *K. pneumoniae* (KP) em *C. elegans* foi avaliada quantitativamente através da medição da taxa de morte dos nematódeos a 20°C. KP exibiu uma redução significativa ($P < 0,05$) no tempo de vida médio de 48 ± 5 h dos nematódeos quando comparado ao controle OP50 com um tempo médio de vida de $21 \pm 0,5$ dias. Além disso, em outro ensaio de morte em meio líquido dos mesmos autores, os nematódeos expostos a *K. pneumoniae*-LPS exibiram uma morte completa ($P < 0,05$) em 200 ± 10 h, 177 ± 5 h e 24 ± 3 h em 0,1, 0,25 e 0,5 mg mL⁻¹, respectivamente (KAMALADEVI; BALAMURUGAN, 2015-2016).

Kamaladevi e Balamurugan (2016), para confirmar o papel da via de sinalização PI3-quinase / AKT / mTOR e PDI-2 na defesa do hospedeiro contra a infecção por *K. pneumoniae*, foi utilizada uma linhagem de *C. elegans* com mutação específica em AKT, mTOR e PDI-2 para análise da sobrevivência destes mutantes durante infecção por *K. pneumoniae*. Os mutantes de AKT, mTOR e PDI-2 expostos com *K. pneumoniae* exibiram um tempo de vida mais curto ($P < 0,05$) (tempo de vida médio de 27 ± 5 , 20 ± 2 , e 12 ± 7 horas, respectivamente) do que os controles (vida média de N2 de 48 ± 5 horas).

V.1.3. Avaliação da sobrevivência da população de *P. pacificus* infectada por *A. baumannii*.

Em relação aos ensaios de infecção com amostras de *A. baumannii* e *P. pacificus* (PS312), os Gráfico 5 e 6 representam as curvas de sobrevivência obtidas durante estes ensaios, e a Tabela 5 representa a LT50 das curvas de sobrevivência.

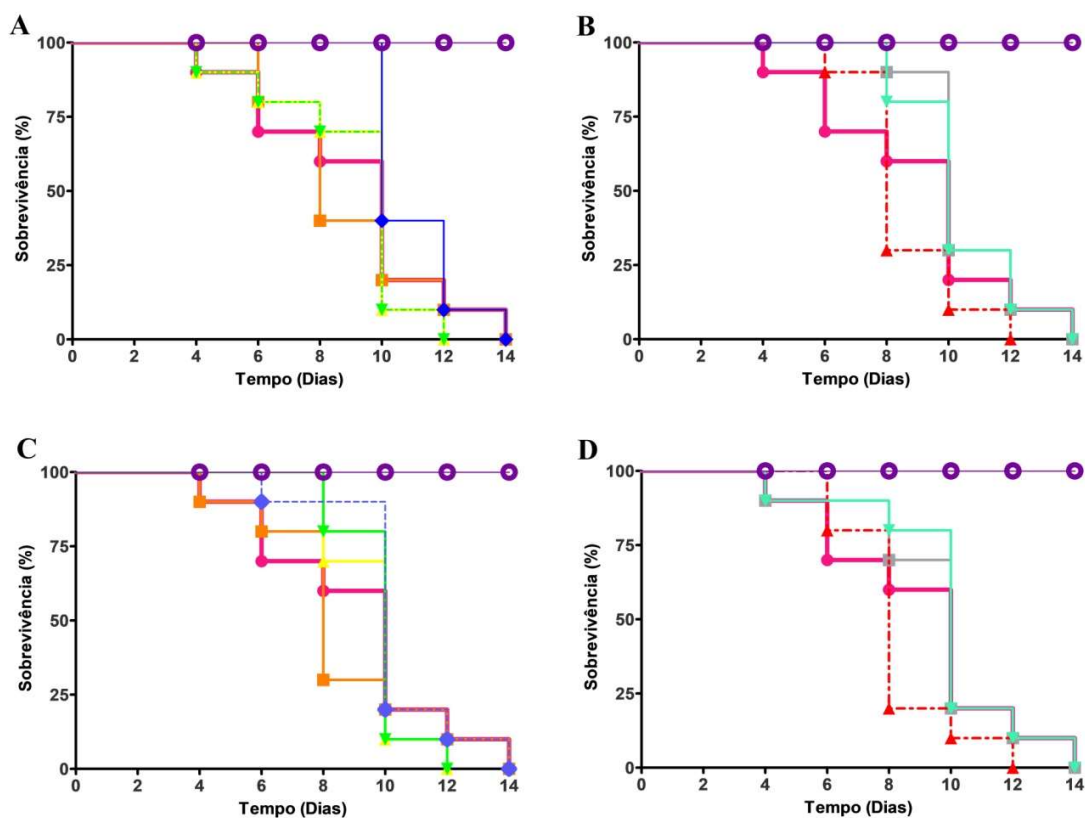


Figura 7. Curvas de sobrevivência de *P. pacificus* (PS312) infectado com das amostras de *A. baumannii*.

As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *P. pacificus* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 14 dias. A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *A. baumannii* Ab06 (★), Ab17 (▼), e Ab25 (▲) tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 12 dias, quando comparada com a amostra de referência de *A. baumannii* ATCC Ab (●) ($p < 0,05$) e as outras amostras clínicas Ab05 (■), Ab18 (◆), Ab21 (■) e Ab26 (▼) ($p < 0,05$), com sobrevivência de 14 dias. A população de *P. pacificus* incubadas com *E. coli* OP50 (⊖), sua alimentação normal, sobreviveram 22 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

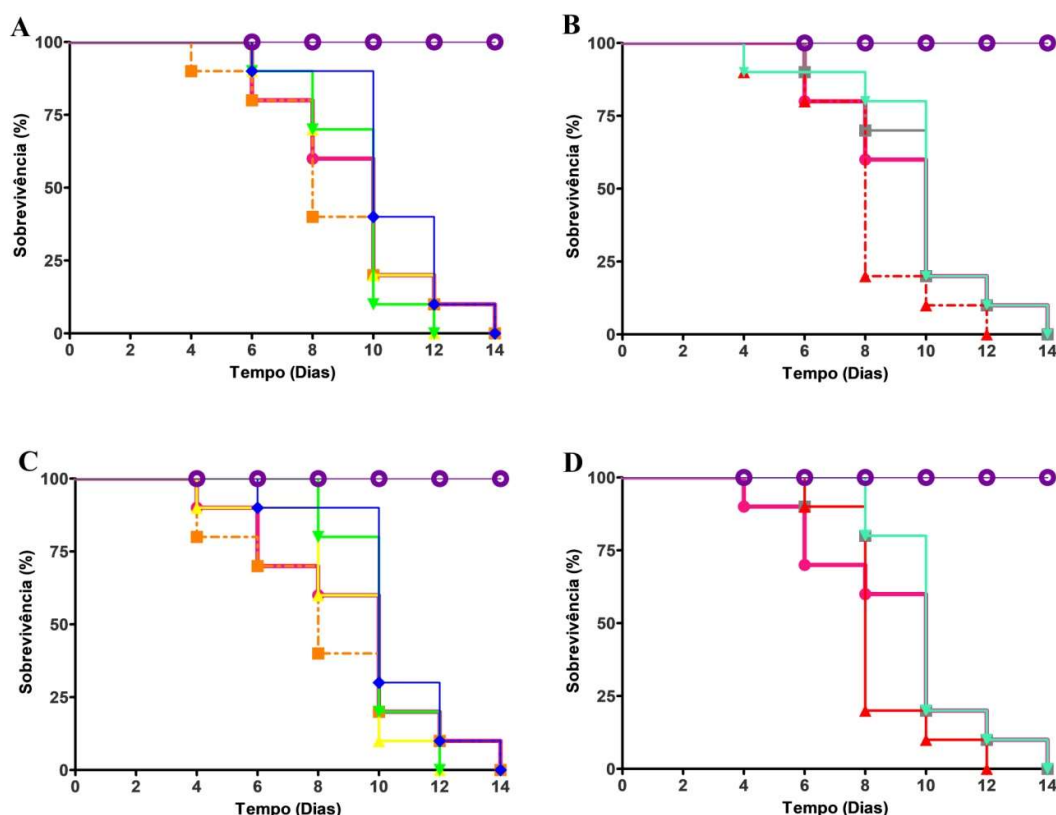


Figura 8. Curvas de sobrevivência de *P. pacificus* (PS312) infectado com das amostras de *A. baumannii*.

As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *P. pacificus* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 14 dias. A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *A. baumannii* Ab06 (★), Ab17 (★), e Ab25 (▲) tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 12 dias, quando comparada com a amostra de referência de *A. baumannii* ATCC Ab (●) ($p < 0,05$) e as outras amostras clínicas Ab05 (■), Ab18 (◆), Ab21 (■) e Ab26 (▲) ($p < 0,05$), com sobrevivência de 14 dias. A população de *P. pacificus* incubadas com *E. coli* OP50 (⊕), sua alimentação normal, sobreviveram 22 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *A. baumannii* Ab06, Ab17 e Ab25 tiveram a menor taxa de sobrevivência, em 12 dias (Gráficos 5 e 6), com LT50 de 10, 10 e 8 dias (Tabela 5), respectivamente, quando comparada com a amostra de referência de *A. baumannii* ATCC 19606 (ATCC Ab) ($p < 0,05$) e as outras amostras clínicas Ab05, Ab18, Ab21 e Ab26 ($p < 0,05$), com sobrevivência de 14 dias (Gráfico 5 e 6) e LT50 de 10, 8, 10, 10 e

10 dias (Tabela 5), respectivamente. As amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25 apresentaram maior patogenicidade em relação à amostra de referência ATCC Ab e entre as outras amostras clínicas. No entanto, não foi observada uma diferença estatística significativa entre as amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25 e a infecção pela amostra de referência ATCC Ab e com as outras amostras clínicas.

As amostras clínicas Ab05 e Ab25 apresentaram uma diferença significativa de sobrevivência em comparação a amostra de referência ATCC Ab e com as amostras clínicas Ab06, Ab17, Ab18, Ab21 e Ab26 ($p < 0,05$).

Tabela 5 - LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por amostras de *A. baumannii* em *P. pacificus* (PS312)

LT50 (Dias)			
Experimento 1		Experimento 2	
ATCC Ab	10 dias	ATCC ab	10 dias
Ab05	8 dias	Ab05	8 dias
Ab06	10 dias	Ab06	10 dias
Ab17	10 dias	Ab17	10 dias
Ab18	10 dias	Ab18	10 dias
Ab21	10 dias	Ab21	10 dias
Ab25	8 dias	Ab25	8 dias
Ab26	10 dias	Ab26	10 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

V.1.4. Avaliação da sobrevivência da população de *C. elegans* infectada por *K. pneumoniae*.

Os resultados das curvas de sobrevivência dos ensaios de infecção com amostras de *K. pneumoniae* no modelo alternativo *P. pacificus* (PS312), foram representados nos Gráfico 7 e 8, e os valores de LT50 na Tabela 6.

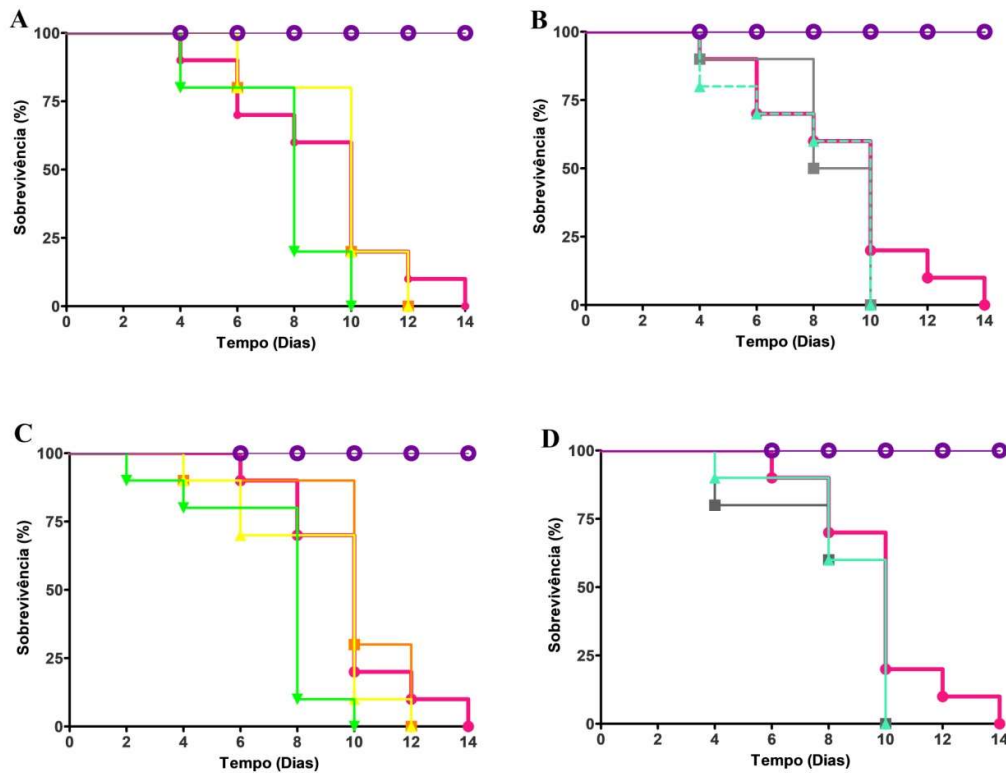


Figura 9. Curvas de sobrevivência de *P. pacificus* (PS312) infectado com das amostras de *K. pneumoniae*.

As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *P. pacificus* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 14 dias. A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U14 (▽), V11 (■) e P5 (▲) tiveram uma menor taxa de sobrevivência, com 10 dias, quando comparado com as outras amostras clínicas U4 (◻) e U10 (★), com sobrevivência de 12 dias; e a amostra de referência ATCC Kp (●), com sobrevivência de 14 dias. Foi observada uma diferença significativa de sobrevivência para as amostras clínicas U14 e V11 quando comparados à amostra de referência ATCC Kp e com as amostras clínicas U4 e U10 ($p < 0,05$). A população de *P. pacificus* incubadas com *E. coli* OP50 (⊕), sua alimentação normal, sobreviveram 22 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

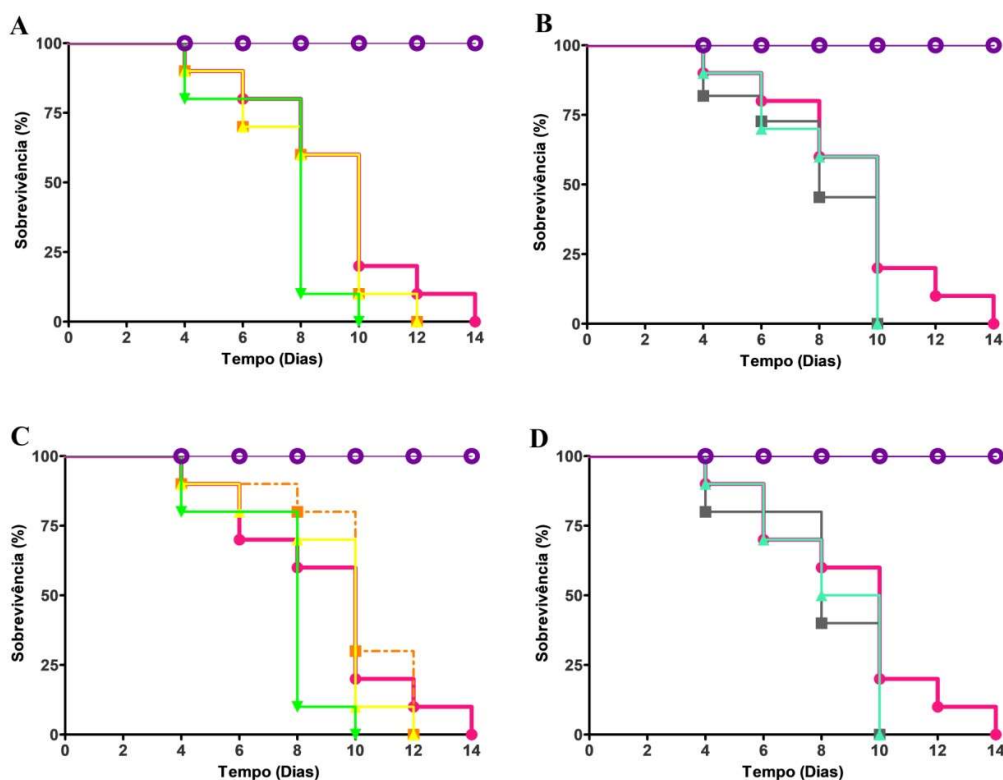


Figura 10. Curvas de sobrevivência de *P. pacificus* (PS312) infectado com das amostras de *K. pneumoniae*. As amostras de *A. baumannii* foram incubadas com *P. pacificus* a 25°C em meio NGM, e a sobrevivência foi monitorada a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos, que ocorreu em 14 dias. A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U14 (▲), V11 (■) e P5 (★) tiveram uma menor taxa de sobrevivência, com 10 dias, quando comparado com as outras amostras clínicas U4 (■) e U10 (★), com sobrevivência de 12 dias; e a amostra de referência ATCC Kp (●), com sobrevivência de 14 dias. Foi observada uma diferença significativa de sobrevivência para as amostras clínicas U14 e V11 quando comparados à amostra de referência ATCC Kp e com as amostras clínicas U4 e U10 ($p < 0,05$). A população de *P. pacificus* incubadas com *E. coli* OP50 (⊖), sua alimentação normal, sobreviveram 22 dias. Os dados de sobrevivência dos experimentos foram plotados em uma curva de sobrevivência Kaplan-Meier e a estimativa de sobrevivência foi determinada através dos testes de log-rank.

A população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas de *K. pneumoniae* U14, V11 e P5 tiveram uma menor taxa de sobrevivência, com 10 dias (Gráficos 7 e 8), e LT50 de 8, 8, 10 dias (Tabela 6), respectivamente, quando comparado com as outras amostras clínicas U4 e U10 e a amostra de referência *K. pneumoniae* 13883 (ATCC Kp). Desse modo, as amostras clínicas U14, V11 e P5 apresentaram uma maior patogenicidade em relação às amostras clínicas U4 e U10 e a amostra de referência ATCC Kp. No entanto, foi observada uma diferença

significativa de sobrevivência somente as amostras clínicas U14 e V11 quando comparados a amostra de referência ATCC Kp e com as amostras clínicas U4 e U10 ($p < 0,05$).

Já a população de *P. pacificus* infectada com amostras clínicas U4 e U10 tiveram uma taxa de sobrevivência de 12 dias (Gráficos 7 e 8) e LT50 de 10 dias para ambas as amostras clínicas (Tabela 6).

Em relação à infecção pela amostra de referência ATCC Kp, a população de *P. pacificus* apresentou uma sobrevivência 14 dias (Gráficos 7 e 8) e LT50 de 10 dias (Tabela 6).

Tabela 6 - LT50 (Dias) dos ensaios de infecção por linhagens de *K. pneumoniae* em *P. pacificus* (PS312).

LT50 (Dias)			
Experimento 1		Experimento 2	
ATCC Kp	10 dias	ATCC Kp	10 dias
U4	10 dias	U4	10 dias
U10	10 dias	U10	10 dias
U14	8 dias	U14	8 dias
V11	8 dias	V11	8 dias
P5	10 dias	P5	10 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na literatura não há dados sobre avaliação da patogenicidade durante infecções por *A. baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, utilizando *P. pacificus* como modelo alternativo. Em vista disso, o presente estudo é o primeiro trabalho que utiliza o nematódeo *Pristionchus pacificus* como modelo invertebrado alternativo para a análise da patogenicidade de isolados clínicos de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* com fenótipos de resistência a antimicrobianos.

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que há diferenças na patogenicidade entre as amostras de referências ATCC e isolados clínicos utilizados, nas taxas de sobrevivência entre os grupos de infecção por *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, e também diferenças de susceptibilidade durante as infecções por *A. baumannii* e *K. pneumoniae* em relação aos modelos invertebrados alternativos *C. elegans* e *P. pacificus*.

Nos ensaios de infecção por *A. baumannii* em *C. elegans*, o isolado clínico Ab05 se mostrou o mais patogênico dentre os outros isolados clínicos, pois provocou a morte da

população de *C. elegans* em 6 dias e com LT50 de 4 dias. Os isolados clínicos Ab06 e Ab21 provocaram morte em 8 dias e com LT50 de 6 dias para ambos. Já a amostra de referência ATCC Ab e isolados clínicos Ab17, Ab18, Ab25 e Ab26 provocaram morte em 10 dias, com LT50 de 6 dias, com exceção de Ab17 com LT50 de 5 dias.

Em relação aos ensaios com *K. pneumoniae*, as amostras clínicas U4, U10, U14, V11 e P5 foram mais patogênicas do que a amostra de referência ATCC Kp, com a morte da população de *C. elegans* em 8 dias e LT50 de 4, 6, 5, 6 e 5 dias, respectivamente, enquanto ATCC Kp em 10 dias e LT50 de 6 dias.

Já nos ensaios de infecção por *A. baumannii* em *P. pacificus*, as amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25 foram as mais patogênicas provocando a morte da população de *P. pacificus* em 12 dias e com LT50 de 10, 10 e 8 dias, respectivamente. A amostra de referência ATCC Ab e as amostras clínicas Ab05, Ab18, Ab21 e Ab26, provocaram a morte total da população de *P. pacificus* em 14 dias, com LT50 de 10 dias, com exceção de Ab05 com LT50 de 8 dias.

Nos ensaios de infecção por *K. pneumoniae*, as amostras clínicas U14, V11 e P5 apresentaram maior patogenicidade em relação as outras amostras clínicas e a amostra de referência ATCC Kp, provocando a morte da população de *P. pacificus* em 10 dias e LT50 de 8, 8, 10 dias. As amostras clínicas U4 e U10 provocaram morte em 12 dias e a LT50 foi de 10 dias para ambos os isolados clínicos, enquanto que a amostra de referência ATCC Kp provocou morte em 14 dias e apresentou LT50 de 10 dias.

A amostra clínica Ab05 foi mais patogênica para a população de *C. elegans* do que para a população de *P. pacificus*. Já as amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25 apresentaram maior patogenicidade nos experimentos com *P. pacificus*, porém estes provocaram a morte da população de *C. elegans* em menos tempo (8,10,10 dias, respectivamente) do que nos ensaios de infecção com *P. pacificus* (12 dias).

As amostras clínicas de *K. pneumoniae* U4, U10, U14, V11 e P5, nos ensaios de infecção com *C. elegans* apresentaram maior patogenicidade do que a amostra de referência ATCC Kp. Dentre estas, as amostras clínicas U14, V11 e P5 apresentaram maior patogenicidade nos ensaios com *P. pacificus*, porém nos ensaios com *C. elegans* provocaram a morte da população em menos tempo (8 dias) do que nos ensaios com *P. pacificus* (10 dias).

No estudo, foi observado que a população de *C. elegans* infectada com as amostras clínicas de *A. baumannii* Ab05 e Ab21, com a presença de todos os genes associados a patogenicidade *OmpA*, *Omp33*, *luxI*, *luxR*, *bap*, *wzc* e *gaiU*, morreram mais rapidamente durante os ensaios. Já nos ensaios com *P. pacificus*, as amostras clínicas Ab06, Ab17 e Ab25,

com a presença de alguns destes genes associados a patogenicidade, provocaram uma morte mais rápida dos nematódeos.

Nos ensaios com amostras de *K. pneumoniae*, a população de *C. elegans* infectada com as amostras clínicas U4, U10, U14, V11 e P5, que possuem o gene de resistência *bla_{KPC}*, provocaram uma morte mais rápida dos nematódeos. Entretanto, nos ensaios com *P. pacificus*, comente as amostras clínicas U14, V11 e P5, que também possuem o gene de resistência *bla_{KPC}*, provocaram a morte mais rápida dos nematódeos.

Estes resultados mostram que há diferenças na susceptibilidade entre os modelos alternativos *C. elegans* e *P. pacificus* durante a infecção por amostras clínicas de *A. baumannii* e amostras clínicas de *K. pneumoniae*.

Apesar de não ter estudos de infecção utilizando *P. pacificus* como modelo alternativo para analisar a patogenicidade de *A. baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, existem estudos utilizando *P. pacificus* como modelo alternativo para ensaios de infecção com outros agentes bacterianos, como por exemplo, *Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, e entre outros (RAE *et al.*, 2008; RAE *et al.*, 2010; RAE *et al.*, 2012; SINHA; RAE; SOMMER, 2012). Além disso, a maior parte desses estudos, também utilizam *P. pacificus* como modelo comparativo a *C. elegans*.

Os dados obtidos no presente estudo sobre as diferenças na susceptibilidade durante a infecção por patógenos bacterianos em modelos invertebrados, corroboram com os dados dos estudos a seguir sobre as diferenças de susceptibilidade entre os modelos *C. elegans* e *P. pacificus*, mesmo que seja com diferentes agentes bacterianos de insetos e humanos.

De acordo com o estudo de Rae e colaboradores (2010), 20 linhagens de *Bacillus* (com destaque para *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e outras espécies de *Bacillus*) isoladas do solo, foram patogênicas para *C. elegans* e *P. pacificus* causando mortalidade de 70% a 100% da população em 5 dias e afetando significativamente o desenvolvimento e tamanho da progênie. Dentre estas espécies, três linhagens de *B. cereus* foram mais patogênicas para *C. elegans*, provovendo a mortalidade em menos de 24 horas, enquanto *P. pacificus* permaneceu resistente a infecção por esse patógeno.

Nos estudos de Sinha e colaboradores (2012), foi utilizado uma abordagem de biologia de sistemas e microarrays de genoma inteiro para traçar o perfil da resposta transcricional de *C. elegans* e do nematódeo necromênico *P. pacificus* após a exposição aos quatro patógenos diferentes (*Serratia marcescens*, *Xenorhabdus nematophila*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus thuringiensis* DB27). Os resultados mostraram que *C. elegans* foi suscetível a todos os quatro

patógenos, com morte em 2 a 5 dias quando infectado com os patógenos *S. marcescens*, *X. nematophila*, *S. aureus* e morte em 16 horas quando infectado com *B. thuringiensis* DB27. Já o nematódeo *P. pacificus* foi suscetível apenas a *S. marcescens* e *X. Nematophila* (morte em 8 dias).

No estudo de Rae e colaboradores (2012), a ablação de células precursoras da linha germinativa e subsequente alimentação de *P. pacificus* com o patógeno *Serratia marcescens*, mostrou uma notável resistência a esse patógeno, e que essa resposta é evolutivamente conservada em todo o gênero *Pristionchus*.

Portanto, essa de diferença de susceptibilidade a diferentes patógenos bacterianos observada nos modelos alternativos *C. elegans* e *P. pacificus* pode estar relacionada com a evolução destes organismos e vários outros fatores com por exemplo, ciclo de vida, diferenças morfológicas e moleculares entre estas espécies, tamanho do genoma, *P. pacificus* possui vias metabólicas mais complexas para nutrição comparado a *C. elegans* (DIETERICH *et al.*, 2008; RAE *et al.*, 2012). Além disso, a resistência a patógenos bacterianos está relacionada à expressão diferencial de genes envolvidos na sinalização da insulina, resposta do patógeno, metabolismo lipídico e processos celulares centrais, como tradução ribossomal, função do proteossoma, complexos de poros nucleares (RAE; SINHA; SOMMER, 2012).

Uma hipótese que sustenta essa diferença de susceptibilidade entre *C. elegans* e *P. pacificus*, é o fato do nematódeo *C. elegans* apresentar um aparelho moedor capaz de lisar fisicamente o alimento bacteriano, enquanto *P. pacificus* não possui essa estrutura e pode ingerir células bacterianas inteiras que passam pelo intestino ilesas. A falta de moedor em *P. pacificus* significa que este nematódeo pode ingerir células bacterianas inteiras. Desse modo, essa característica pode ter permitido a *P. pacificus* tolerar uma grande variedade de bactérias nocivas, pois se as células bacterianas não forem perturbadas, as toxinas potencialmente fatais não serão liberadas (RAE *et al.*, 2012; SINHA; RAE; SOMMER, 2012). Consistente com esta hipótese, se *P. pacificus* for alimentado com toxina pura, eles morrerão (WEI *et al.*, 2003;).

Portanto, faz sentido que, se a passagem da bactéria for prolongada e os patógenos potenciais tiverem aumentado o tempo para atacar as células intestinais, então haverá uma chance maior de infecção (RAE *et al.*, 2012). Além disso, a resposta imune dos nematódeos depende fortemente do patógeno ingerido, já que estudos transcriptômicos demonstraram respostas específicas de patógeno e não específicas de patógeno em uma série de bactérias e fungos (ENGELMANN *et al.*, 2011).

Outro fato interessante é que o genoma de *P. pacificus* é maior do que o de *C. elegans*, apresentando 169 Mb e 23.500 genes codificadores de proteínas, enquanto *C. elegans* possui um genoma com 100Mb e 20.444 genes. O número de genes que codificam enzimas de desintoxicação e degradação é relativamente maior em *P. pacificus* podendo contribuir de alguma forma na resistência deste nematódeo a patógenos bacterianos (DIETERICH *et al.*, 2008; RAE *et al.*, 2012).

O modelo alternativo *C. elegans* apresenta muitas vantagens em comparação ao modelo *P. pacificus* quando se trata de estudos sobre as principais vias de resposta a diferentes agentes patogênicos, com por exemplo, bactérias e fungos. Como é um modelo amplamente estudado, são conhecidas várias vias de sinalizações críticas para a sobrevivência de *C. elegans* quando alimentado com uma variedade de patógenos bacterianos (p38 MAP quinase, ERK MAP quinase, TGF β , morte celular programada, sinalização do receptor semelhante à insulina DAF – 2 / DAF – 16 e MAP quinase semelhante a JNK, bem como componentes como a proteína G acoplada receptor FSHR-1, fator de transcrição bZIP zip22 e beta-catenina / bar21 [SINHA, RAE, SOMMER, 2012]); em *C. elegans* 40% do genes estão relacionados a doenças humanas (KALETTA E HENGARTNER, 2006), e disponibilidade de várias técnicas de análises genéticas e moleculares (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Em suma, o presente estudo mostrou que todas amostras de referências e amostras clínicas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* foram patogênicas para os modelos invertebrados alternativos *C. elegans* e *P. pacificus*. A população de *P. pacificus* apresentou uma taxa de sobrevivência maior do que a população de *C. elegans* nos ensaios de infecção por *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Além disso, foi observado diferenças na susceptibilidade desses modelos durante as infecções por estes patógenos.

Foi observado que a população de *C. elegans* e *P. pacificus* infectadas com as amostras clínicas de *A. baumannii*, com a presença de genes associados a patogenicidade, morreram mais rapidamente do que na infecção com a amostra de referência *A. baumannii* ATCC 19606 . Além disso, o mesmo foi observado em relação as amostras clínicas de *K. pneumoniae*, com presença do gene de resistência, que também promoveu uma morte rápida da população destes modelos alternativos do que nas infecção com a amostra de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883.

VI - CONCLUSÕES

A análise da patogenicidade de amostras de referências e amostras clínicas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* nos ensaios de infecções utilizando como modelos invertebrados alternativos *C. elegans* e *P. pacificus*, nos permite concluir que:

- Todas as amostras clínicas e amostras de referências de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* foram patogênicas para os modelos alternativos *C. elegans* e *P. pacificus* durante os ensaios de infecção.
- O modelo *P. pacificus* sobreviveu mais tempo (12 a 14 dias) do que *C. elegans* (6 a 10 dias) durante a infecção pelas amostras clínicas e amostras de referências de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.
- *C. elegans* e *P. pacificus* diferem notavelmente em sua capacidade de tolerar patógenos bacterianos como por exemplo, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, como foi mostrado neste estudo. Portanto, *P. pacificus* torna-se um ótimo modelo satélite para estudos comparativos.

VII - 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.

AGABA, Peter *et al.* Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 349, 2017.

AKDUMAN, Nermin; RÖDELSPERGER, Christian; SOMMER, Ralf J. Culture-based analysis of *Pristionchus*-associated microbiota from beetles and figs for studying nematode-bacterial interactions. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198018, 2018.

AL-AGAMY, Mohamed H. *et al.* First detection of GES-5 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolate. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 5, p. 556-562, 2017.

AL ATROUNI, Ahmad *et al.* Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 52, p. 29-36, 2016.

ALMASAUDI, Saad B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.

ALYSSA, S. S.; RAJINDER, P. S. B.; THOMAS, A. R. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. A new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, p. 2, 2013.

ANDERSON, D. J. Surgical site infections. **Infectious Diseases Clinics**: 25(1), p.135, 2011.

ANTUNES, Luísa; VISCA, Paolo; TOWNER, Kevin J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and disease**, v. 71, n. 3, p. 292-301, 2014.

ARNOLD, Ryan S. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *Southern medical journal*, v. 104, n. 1, p. 40, 2011.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Disponível em: < <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/>>. Acesso em: 20 Mar. 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios diagnósticos de infecção relacionada à assistência à saúde do ano de 2017. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+2+-+Crit%C3%A9rios+Diagn%C3%B3sticos+de+Infec%C3%A7%C3%A3o+Relacionada+%C3%A0+Assist%C3%Aancia+%C3%A0+Sa%C3%BAde/7485b45a-074f-4b34-8868-61f1e5724501>>. Acesso em: 23 Março 2020.

ARDEHALI, Seyed Hossein *et al.* Role of efflux pumps in reduced susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. **New microbes and new infections**, v. 30, p. 100547, 2019.

ARMY MEDICAL CENTER. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4114-4123, 2006.

ARVANITIS, Marios; GLAVIS-BLOOM, Justin; MYLONAKIS, Eleftherios. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013.

ASHRAFI, Kaveh. Obesity and the regulation of fat metabolism. In: **WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]**. WormBook, 2007.

ASIF, Muhammad; ALVI, Iqbal Ahmad; REHMAN, Shafiq Ur. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1249, 2018.

AVILA, Daiana; HELMCKE, Kirsten; ASCHNER, Michael. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. **Human & experimental toxicology**, v. 31, n. 3, p. 236-243, 2012.

BANACH, David B.; CALFEE, David P. Central Line-Associated Bloodstream Infection. **Healthcare Associated Infections: A Case-based Approach to Diagnosis and Management**, 2013.

BARKER, D.; FITZPATRICK, M. P.; DIERENFELD, E. S. Nutrient composition of selected whole invertebrates. **Zoo Biology**, v. 17, n. 2, p. 123–134, 1998.

BAUMANN, Paul; DOUDOROFF, Michael; STANIER, R. Y. A study of the *Moraxella* group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of bacteriology**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.

BECKER, Karsten; HEILMANN, Christine; PETERS, Georg. Coagulase-negative *staphylococci*. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

BEIJERINCK, M. W. Über pigmentbildung bei essigbakterien. **Cent Bakteriol Parasitenk**, v. 29, p. 169-76, 1911.

BENGOECHEA, Jose A.; SA PESSOA, Joana. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS microbiology reviews**, v. 43, n. 2, p. 123-144, 2019.

BENTO, Gilberto; OGAWA, Akira; SOMMER, Ralf J. Co-option of the hormone-signalling module dafachronic acid–DAF-12 in nematode evolution. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 494, 2010.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 2, p. 148, 1996.

BENGOCHEA, Jose A.; SA PESSOA, Joana. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, v. 43, n. 2, p. 123-144, 2019.

BENSLEY EH. 1932. A case of Friedlander's pneumonia. *Can Med Assoc J* 26:681– 684.

BIALEK, Suzanne et al. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4373-4378, 2010.

BIALEK-DAVENET, Suzanne *et al.* Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 81-88, 2015.

BONOMO, Robert A.; SZABO, Dora. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. Supplement_2, p. S49-S56, 2006.

BOSE, Neelanjan *et al.* Complex small-molecule architectures regulate phenotypic plasticity in a nematode. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 50, p. 12438-12443, 2012.

BOUVET, Philippe JM; GRIMONT, Patrick AD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde Gabinete do Ministro. **Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html> Acesso em 20 de Setembro de 2018.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BRISOU, J.; PREVOT, A. R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. In: **Annales de l'Institut Pasteur**. 1954. p. 722-728.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

BUSH, Karen. Metallo- β -lactamases: a class apart. **Clinical infectious diseases**, v. 27, n. Supplement_1, p. S48-S53, 1998.

CAMPOS, Anaelís C. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K pneumoniae: A systematic review. *American journal of infection control*, v. 44, n. 11, p. 1374-1380, 2016.

CASTANHEIRA, Mariana *et al.* Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CASTILHO, Suellen Rocha Araújo *et al.* *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176790, 2017

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC *et al.* *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured US service members, 2002-2004. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 53, n. 45, p. 1063, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.* Vital signs: central line-associated blood stream infections—United States, 2001, 2008, and 2009. **Annals of Emergency Medicine**, v. 58, n. 5, p. 447-450, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. Urinary tract infection (catheter-associated urinary tract infection [CAUTI] and non-catheter-associated urinary tract infection [UTI]) and other urinary system infection [USI]) events. **Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA: <http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/7pscCAUTIcurrent.pdf>**, 2015.

CHAMBERS, Henry F. Community-associated MRSA—resistance and virulence converge. 2005.

CHANG, Wen-Neng et al. Adult *Klebsiella pneumoniae* meningitis in Taiwan: an overview. *Acta Neurol Taiwan*, v. 21, n. 2, p. 87-96, 2012.

CHOI, Chul Hee et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC microbiology**, v. 8, n. 1, p. 216, 2008.

CHUNG, D. R. et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 31, n. 4, p. 481-486, 2012.

CIENFUEGOS-GALLET, Astrid V. et al. Risk factors and survival of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a KPC endemic setting: a case-control and cohort study. *BMC infectious diseases*, v. 19, n. 1, p. 830, 2019.

COOK, Steven J. et al. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. **Nature**, v. 571, n. 7763, p. 63-71, 2019.

CORSI, Ann K.; WIGHTMAN, Bruce; CHALFIE, Martin. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

CORTÉS, Guadalupe et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and immunity*, v. 70, n. 5, p. 2583-2590, 2002.

COSGAYA, Clara *et al.* *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4105-4111, 2016.

CRAVEN, Donald E.; HJALMARSON, Karin I. Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: thinking outside the box. **Clinical infectious diseases**, v. 51, n. Supplement_1, p. S59-S66, 2010.

CRESS, Brady F. *et al.* Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 4, p. 660-697, 2014.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. 1 ed. Posto Alegre: Artmed, p. 944, 2012.

DALLA-COSTA, Libera M. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3403-3406, 2003.

DANASEKARAN, Raja; MANI, Geetha; ANNADURAI, Kalaivani. Prevention of healthcare-associated infections: protecting patients, saving lives. **International Journal of Community Medicine and Public Health**, v. 1, n. 1, p. 67-68, 2017.

DA SILVA, Andre Pires. *Pristionchus pacificus* protocols. **WormBook**, 2013.

DARBY, Creg. Interactions with microbial pathogens. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. **WormBook**, 2005.

DAT, Vu Quoc *et al.* Bacterial bloodstream infections in a tertiary infectious diseases hospital in Northern Vietnam: etiology, drug resistance, and treatment outcome. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 493, 2017.

DAVIS, Kepler A. *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1218, 2005.

DE ROSA, Francesco G. *et al.* Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPCcarbapenemase producing *K. pneumoniae* infections: a critical agenda. *Future microbiology*, v. 10, n. 2, p. 283-294, 2015.

DIETERICH, Christoph *et al.* The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. **Nature genetics**, v. 40, n. 10, p. 1193, 2008.

DIVO, Miguel J.; MARTINEZ, Carlos H.; MANNINO, David M. Ageing and the epidemiology of multimorbidity. 2014.

ELIOPOULOS, George M.; BUSH, Karen. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

ELIOPOULOS, George M.; MARAGAKIS, Lisa L.; PERL, Trish M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254-1263, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. Available at: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> [Acesso em Março de 2020].

ESCANDE, M. C. *et al.* Prospective study of bacteremia in cancer patients. **Supportive care in Cancer**, v. 6, n. 3, p. 273-280, 1998.

ESPINAL, P. *et al.* Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5396-5398, 2011.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. **Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network** (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.

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: 28 Mar. 2020.

FALAGAS, Matthew E.; KASIAKOU, Sofia K.; SARAVOLATZ, Louis D. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333-1341, 2005.

FALAGAS, Matthew E.; BLIZIOTIS, Ioannis A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n. 6, p. 630-636, 2007.

FALAGAS, Matthew E. et al. Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 7, p. 1170, 2014.

FEHLBERG, Lorena CC et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 577-580, 2012.

FAJARDO BONIN, Renata *et al.* Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 8, n. 11-12, p. 916-923, 2014.

FAZILI, Tasaduq *et al.* *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging disease. *The American journal of the medical sciences*, v. 351, n. 3, p. 297-304, 2016.

FERRANDON, Dominique *et al.* The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 862, 2007.

FERREIRA, Alessandra Einsfeld. Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar. 2010.

FINKE, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. **Zoo Biology**, v. 21, n. 3, p. 269–285, 27, 2002.

FRIEDLÄNDER, Carl. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, v. 87, n. 2, p. 319-324, 1882.

FOURNIER, Pierre Edouard; RICHET, Hervé; WEINSTEIN, Robert A. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 5, p. 692-699, 2006.

FOURNIER, Pierre-Edouard *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS genetics**, v. 2, n. 1, p. e7, 2006.

FUCHS, B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, 475-482. 2010.

GALES, Ana C. *et al.* Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 1, p. 77-79, 2003.

GALES, Ana Cristina; JONES, R. N.; SADER, Helio Silva. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 4, p. 315-321, 2006.

GALES, Ana C. et al. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GAVA, S. G. **Estudo funcional da proteína quinase JNK de *Schistosoma mansoni* através de expressão heteróloga no organismo modelo *Caenorhabditiselegans***. Belo Horizonte, MG: 2013. Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou.

GEISINGER, Edward; ISBERG, Ralph R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 2, 2015.

GEISINGER, Edward *et al.* *Acinetobacter baumannii*: envelope determinants that control drug resistance, virulence, and surface variability. **Annual review of microbiology**, v. 73, p. 481-506, 2019.

GIAMMANCO, Anna *et al.* Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. **Msphere**, v. 2, n. 1, p. e00310-16, 2017.

GIANI, Tommaso *et al.* Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Eurosurveillance*, v. 18, n. 22, p. 20489, 2013.

GORRIE, Claire L. *et al.* Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clinical infectious diseases*, v. 65, n. 2, p. 208-215, 2017.

GREENE, Christine *et al.* Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Letters in applied microbiology**, v. 63, n. 4, p. 233-239, 2016.

GOMEZ, Sonia A. *et al.* Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clinical microbiology and infection*, v. 17, n. 10, p. 1520-1524, 2011.

GUSATTI, Carolina de Souza *et al.* Resistência a beta-lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Rio de Janeiro. Vol. 42, nol. 2 (mar./abr. 2009), p. 183-187, 2009.**

GYSENS, I. C. Animal models for research in human infectious diseases. CMI editorial policy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 6, p. 649-650, 2019.

HALL, Barry G.; BARLOW, Miriam. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050-1051, 2005.

HAMOUDA, Ahmed. Identification of *Acinetobacter baumannii* of human and animal origins by a gene-specific PCR. **Current microbiology**, v. 74, n. 9, p. 1118-1122, 2017.

HARDING, Christian M.; HENNON, Seth W.; FELDMAN, Mario F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91, 2018.

HARDING, Christian M. *et al.* Distinct amino acid residues confer one of three UDP-sugar substrate specificities in *Acinetobacter baumannii* PglC phosphoglycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 28, n. 7, p. 522-533, 2018.

HASSAN, Afreenish *et al.* Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 732, 2016.

HAWLEY, Joshua S. *et al.* Susceptibility of *Acinetobacter* strains isolated from deployed US military personnel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 376-378, 2007.

HÉRITIER, Claire *et al.* Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3198-3202, 2005.

HERSH, A. L., Chambers, H. F., Maselli, J. H. & Gonzales, R. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1585–1591(2008).

HIDRON, Alicia I. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HORNSEY, Michael *et al.* AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1589-1593, 2010.

HORNSEY, Michael *et al.* Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1499-1503, 2011.

HOFFMAN-ROBERTS, Holly *et al.* National prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the ambulatory and acute care settings, including carbapenem-resistant acinetobacter infections, in the United States in 2015. **In: Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2016. p. 1488.

HONG, Ray L.; SOMMER, Ralf J. *Pristionchus pacificus*: a well-rounded nematode. **Bioessays**, v. 28, n. 6, p. 651-659, 2006.

HOPE, R., Livermore, D. M., Brick, G., Lillie, M. & Reynolds, R. Non-susceptibility trends among *staphylococci* from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–2006. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **62** (Suppl. 2), 65–74 (2008).

HORASAN, E. S. *et al.* Bloodstream infections and mortality-related factors in febrile neutropenic cancer patients. **Med.Sci.Monit.**, v. 17, n. 1643-3750 (Electronic), p. 5 CR304–CR309, 2011.

HUANG, Xiaowen *et al.* *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode infection model for *Penicillium marneffe*. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108764, 2014.

HUEBNER, MD, Johannes; GOLDMANN, MD, Donald A. Coagulase-negative *staphylococci*: role as pathogens. **Annual review of medicine**, v. 50, n. 1, p. 223-236, 1999.

HUJER, Kristine M. *et al.* Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4114-4123, 2006.

HUNTER, John D. Ventilator associated pneumonia. **Bmj**, v. 344, n. e3325, p. e3225, 2012.

HU, Patrick J. Dauer. **WormBook: the online review of *C. elegans* biology**, p. 1-19, 2007.

HSIEH, Pei-Fang *et al.* Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. *PloS one*, v. 7, n. 3, p. e33155, 2012.

IATSENKO, Igor; NIKOLOV, Angel; SOMMER, Ralf J. Identification of distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 nematocidal factors using the model nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. **Toxins**, v. 6, n. 7, p. 2050-2063, 2014.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC *et al.* Classification of *staphylococcal* cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, 2009.

JEON, Byung-Chan *et al.* Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2241-2245, 2005.

JEON, Jeong Ho *et al.* Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 9654-9692, 2015.

JIN, Jong Sook 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.

JUN, So Hyun et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. **PloS one**, v. 8, n. 8, 2013.

KALETTA, Titus; HENGARTNER, Michael O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KANAFANI, A.Z., KANJ, S.S., 2014. **Ministry of Health, Kingdome of Saudi Arabia**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/acinetobacterinfection-treatment-and-prevention>>. Acesso em 8 de Abr. 2020.

KASIMOVA, Anastasiya A. et al. Structure of the K82 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5534 containing a D-galactose 4, 6-pyruvic acid acetal. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 7, p. 831-835, 2018.

KAMALADEVI, Arumugam; BALAMURUGAN, Krishnaswamy. Response of *Caenorhabditis elegans* during *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. S3, p. P8, 2014.

KAMALADEVI, Arumugam; BALAMURUGAN, Krishnaswamy. Role of PMK-1/p38 MAPK defense in *Caenorhabditis elegans* against *Klebsiella pneumoniae* infection during host–pathogen interaction. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 5, p. ftv021, 2015.

KAMALADEVI, Arumugam; BALAMURUGAN, Krishnaswamy. Lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* attenuates immunity of *Caenorhabditis elegans* and evades by altering its supramolecular structure. **RSC advances**, v. 6, n. 36, p. 30070-30080, 2016.

KAMALADEVI, Arumugam; BALAMURUGAN, Krishnaswamy. Global proteomics revealed *Klebsiella pneumoniae* induced autophagy and oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway during infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 393, 2017.

KATO, Masaomi; SLACK, Frank J. microRNAs: small molecules with big roles—*C. elegans* to human cancer. ***Biology of the Cell***, v. 100, n. 2, p. 71-81, 2008.

KENYON, Johanna J. et al. Structure of the K6 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* isolate RBH4. ***Carbohydrate research***, v. 409, p. 30-35, 2015.

KIDD, Timothy J. et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. *EMBO molecular medicine*, v. 9, n. 4, p. 430-447, 2017.

KIM, Sang Woo *et al.* Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. ***FEMS microbiology letters***, v. 301, n. 2, p. 224-231, 2009.

KOENIG, Steven M.; TRUWIT, Jonathon D. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. ***Clinical microbiology reviews***, v. 19, n. 4, p. 637-657, 2006.

KONEMAN, E. W. et al. *Koneman Diagnostico microbiologico: texto e atlas colorido*. 2008.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDRA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2008.

KRAHN, Thomas *et al.* Intraspecies transfer of the chromosomally encoded *Acinetobacter baumannii* bla_{NDM-1} carbapenemase gene. ***Antimicrobial agents and chemotherapy***, p. AAC. 00124-16, 2016.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: an overview. ***Cold Spring Harb Perspect, Med*** 6: a027029. 2016.

KUEHN, Bridget M. "Nightmare" bacteria on the rise in US hospitals, long-term care facilities. *Jama*, v. 309, n. 15, p. 1573-1574, 2013.

KULP, Adam; KUEHN, Meta J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 163-184, 2010.

KWON, Sang-Oh et al. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. **FEMS microbiology letters**, v. 297, n. 2, p. 150-156, 2009.

LAM, Margaret MC et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microbial genomics*, v. 4, n. 9, 2018.

LAURETTI, Laura *et al.* Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LA SCOLA, Bernard *et al.* Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.

LAVIGNE, Jean-Philippe *et al.* Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PloS one*, v. 8, n. 7, p. e67847, 2013.

LAWLOR, Matthew S. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Molecular microbiology*, v. 58, n. 4, p. 1054-1073, 2005.

LAWLOR, Matthew S.; HANDLEY, Scott A.; MILLER, Virginia L. Comparison of the host responses to wild-type and cpsB mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infection and immunity*, v. 74, n. 9, p. 5402-5407, 2006.

LEE, Kyungwon *et al.* Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LEE, Kyungwon *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. **Yonsei medical journal**, v. 52, n. 6, p. 879-891, 2011.

LEE, H.*et al.* Nictation, a dispersal behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*, is regulated by IL2 neurons. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 107-112, 2012.

LEE, Chang-Ro *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 895, 2016.

LEE, Chang-Ro *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 2017.

LEES-MILLER, Robert G. *et al.* A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. **Molecular microbiology**, v. 89, n. 5, p. 816-830, 2013.

LESSEL, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 213-214, 1971.

LI, Jian *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2946-2950, 2006.

LI, D-D.; DENG, L.; HU, G. H. *et al.* Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 1 set. 2013.

LI, Zhi-Tao et al. Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. **Microbial pathogenesis**, v. 81, p. 46-52, 2015.

LIN, Ming-Feng *et al.* Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 119, 2014.

LIN, Yi-Tsung et al. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 307, 2010.

LIN, Yi-Tsung et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 13, 2012.

LIN, Ming-Feng; LAN, Chung-Yu. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 2, n. 12, p. 787, 2014.

LOB, Sibylle H. *et al.* Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 47, n. 4, p. 317-323, 2016.

LONGO, Francesca; VUOTTO, Claudia; DONELLI, Gianfranco. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 119-127, 2014.

LUIZ, S. O. **Caracterização da resistência de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas no hospital de clínicas de Curitiba, 2006**. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Micologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba. MATOS, FJA Farmacognosia de *Luffa operculata* cogn. *Rev. Brasileira Farm.*

MAGILL, Shelley S. *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MARTÍNEZ, Julio *et al.* How are gene sequences analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *International microbiology*, v. 7, n. 4, p. 261-268, 2004.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 4, 2018.

MARTIN, Rebekah M. *et al.* Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Msphere*, v. 1, n. 5, 2016.

MARTIN, Jessica *et al.* Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long-and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 11, p. 3025-3034, 2017.

MARSH, E. K.; MAY, R. C. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2075-2081, 2012.

MARCH, Catalina *et al.* Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PloS one*, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013.

MARTIN, R. D.; RIVERS, J. P. W.; COWGILL, U. M. Culturing mealworms as food for animals in captivity. **International Zoo Yearbook**, v. 16, n. 1, p. 63-70, 1976.

MAVROIDI, Angeliki *et al.* Identification and characterization of genetic structures coding for carbapenemases in enterobacteria from Central Greece. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 81, n. 1, p. 47-49, 2015.

MCCONNELL, Michael J.; ACTIS, Luis; PACHÓN, Jerónimo. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013.

MCDUGALD, Diane et al. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39-50, 2012.

MELSEN, Wilhelmina G. *et al.* Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies. **Critical care medicine**, v. 39, n. 12, p. 2736-2742, 2011.

MEYER, Jan M. *et al.* Succession and dynamics of *Pristionchus* nematodes and their microbiome during decomposition of *Oryctes borbonicus* on La Réunion Island. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1476-1489, 2017.

MILLS, Grant *et al.* Identification and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* lpxL lipid A late acyltransferases and their role in virulence. *Infection and immunity*, v. 85, n. 9, 2017.

MOGYORÓDI, Bence *et al.* Ventilator-associated pneumonia and the importance of education of ICU nurses on prevention—Preliminary results. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 8, n. 4, p. 147-151, 2016.

MOON, Dong Chan et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 155-160, 2012.

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MORTENSEN, Brittany L.; SKAAR, Eric P. Host–microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 9, p. 1336-1344, 2012.

MUHAMMED, M.; COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. Host-Fungus Interactions. v. 845, p. 447–454, 2012.

MUNOZ-PRICE, L. Silvia et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

MUGNIER, Pauline D. et al. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*1. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 35, 2010.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**.6ª Edição. Editora: Elsevier, 2010.

MURPHY, Tanya A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 582-587, 2003.

MYLONAKIS, Eleftherios et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3833-3841, 2005.

NAAS, Thierry et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4826-4829, 2005.

NEJAD, Sepideh Bagheri et al. Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, p. 757-765, 2011.

NEMEC, Alexandr et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 65, n. 3, p. 934-942, 2015.

NEMEC, Alexandr *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov.(formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov.(formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Research in microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393-404, 2011.

NORDMANN, Patrice; DORTET, Laurent; POIREL, Laurent. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

OLIVEIRA A, C; ANDRADE F, S; PISCOYA M, E; IQUIAPAZA R, A. Colonização por micro-organismo resistente e infecção relacionada ao cuidar em saúde. **Acta Paul Enferm.** v.25, nº 2, p.183-9. 2012.

OSANO, E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994.

OWENS, C. D.; STOESSEL, K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, p. 3-10, 2008.

PAGANO, M. *et al.* Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream bla OXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 2, p. 330-333, 2013.

PAN, Yi-Jiun *et al.* Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 79, n. 3, p. 997-1006, 2011.

PAPAGIANNITSIS, C. C. *et al.* Emergence of Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1 and VIM-1 metallo- β -lactamases in a Greek hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016.

PAYNE, David J. Desperately seeking new antibiotics. **Science**, v. 321, n. 5896, p. 1644-1645, 2008.

PEREZ, Federico *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 51, n. 10, p. 3471-3484, 2007.

PELEG, Anton Y.; SEIFERT, Harald; PATERSON, David L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PENG, Shih-Yi *et al.* Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the *Acinetobacter baumannii* phage endolysin LysAB2. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11477, 2017.

PATERSON, David L.; SIU, K. L.; CHANG, Feng Yee. *Klebsiella species (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae and K. rhinoscleromatis)*. *Antimicrobe*, v. 9, p. 74-76, 2014.

PEREIRA, Carlos Alberto Pires *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. **PloS one**, v. 8, n. 7, 2013.

PEREZ, Federico *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3471-3484, 2007.

PIRES-DASILVA, Andre. *Pristionchus pacificus* protocols. 2005.

PLAYFORD, E. G.; CRAIG, J. C.; IREDELL, J. R. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 3, p. 204-211, 2007.

POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

PORTA-DE-LA-RIVA, Montserrat *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 64, 2012.

POWELL, Jennifer R.; AUSUBEL, Frederick M. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. In: **Innate immunity**. Humana Press, 2008. p. 403-427.

PRETENDIDA, UTILIZAÇÃO; DO PROCEDIMENTO, PRINCÍPIOS E. EXPLICAÇÃO. BD Brain Heart Infusion Agar with 10% Sheep Blood.

PRONOVOST, Peter *et al.* An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2725-2732, 2006.

RAE, Robbie *et al.* Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. *Journal of Experimental Biology*, v. 211, n. 12, p. 1927-1936, 2008.

RAE, Robbie *et al.* A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. *Environmental microbiology*, v. 12, n. 11, p. 3007-3021, 2010.

RAE, Robbie *et al.* The importance of being regular: *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus* defecation mutants are hypersusceptible to bacterial pathogens. *International journal for parasitology*, v. 42, n. 8, p. 747-753, 2012.

RAE, Robbie; SINHA, Amit; SOMMER, Ralf J. Genome-wide analysis of germline signaling genes regulating longevity and innate immunity in the nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS pathogens*, v. 8, n. 8, p. e1002864, 2012.

RICE, Louis B. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. Supplement_2, p. S100-S105, 2006.

RIDDLE, D. L., BLUMENTHAL, T., MEYER, B. J., & PRIESS, J. R. **Introduction to *C. elegans***. Cold Spring Harbor Monograph Archive, v. 33, p. 1-22, 1997.

RIGATTI, Fabiane *et al.* Bacteremias por *Staphylococcus coagulase* negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 686-690, 2010.

RHOADS R.E., DINKOVA T.D., KORNEEVA N.L. Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. In: The *C. elegans* Research Community, editor. WormBook. 2006.

ROJAS, L. J. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, n. 2, p. 1101-1102, 2013.

ROSSI, Benjamin *et al.* Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in cryptogenic liver abscesses, Paris, France. *Emerging infectious diseases*, v. 24, n. 2, p. 221, 2018.

RUSSO, Thomas A. *et al.* The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization. **Infection and immunity**, v. 81, n. 3, p. 915-922, 2013.

SABER, H.; JASNI, A.S.; JAMALUDDIN, T.Z.M.T.; IBRAHIM, R. A review of *Staphylococcal* cassette chromosome mec (SCCmec) types in coagulase-negative 25 *Staphylococci* (CoNS) species. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v.24, p 7-18, 2017.

SCOTT, R. Douglas. The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention. 2009.

SCOTT, Euan *et al.* Intra Strain Variation of the Effects of Gram-Negative ESKAPE Pathogens on Intestinal Colonization, Host Viability, and Host Response in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in microbiology*, v. 10, 2019.

SMANI, Younes; MCCONNELL, Michael J.; PACHÓN, Jerónimo. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, 2012.

SMANI, Younes *et al.* Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1806-1808, 2014.

SINHA, Amit *et al.* System wide analysis of the evolution of innate immunity in the nematode model species *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. *PloS one*, v. 7, n. 9, p. e44255, 2012.

STIERNAGLE, Theresa. Maintenance of *Caenorhabditis elegans*. **C. elegans**, v. 2, p. 51-67, 1999.

STIERNAGLE, Theresa. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1. 2006.

STOESSER, Nicole *et al.* Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

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

SOHRABI, Nasrollah *et al.* Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 385-389, 2012.

SOMMER, Ralf J. *et al.* Morphological, genetic and molecular description of *Pristionchus pacificus* sp. n. (Nematoda: Neodiplogasteridae). **Fundamental and applied Nematology**, v. 19, p. 511-522, 1996.

SOMMER, Ralf J.; STERNBERG, Paul W. Apoptosis and change of competence limit the size of the vulva equivalence group in *Pristionchus pacificus*: a genetic analysis. **Current Biology**, v. 6, n. 1, p. 52-59, 1996.

SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUBHADRA, Bindu; OH, Man Hwan; CHOI, Chul Hee. Quorum sensing in *Acinetobacter*: with special emphasis on antibiotic resistance, biofilm formation and quorum quenching. **AIMS Microbiol**, v. 2, n. 1, p. 27-41, 2016.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, v. 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, v. 77, n. 11, p. 5016-5024, 2009.

SYDNOR, Emily RM; PERL, Trish M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 141-173, 2011.

TÄNGDÉN, Thomas; GISKE, C. G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine*, v. 277, n. 5, p. 501-512, 2015.

THOMAS, Varsha M. et al. Synergistic effect between nisin and polymyxin B against pandrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 5, p. 663-668, 2019.

THOMSON, Jodi M.; BONOMO, Robert A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 5, p. 518-524, 2005.

THOMPSON, Mitchell G. et al. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1332-1342, 2014.

TOUCHON, Marie *et al.* The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 10, p. 2866-2882, 2014.

TOLEMAN, Mark A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TOMARAS, Andrew P. *et al.* Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3473-3484, 2003.

TREDE, Nikolaus S. *et al.* The use of zebrafish to understand immunity. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 367-379, 2004.

TRILLA, A. Epidemiology of nosocomial infections in adult intensive care units. **Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 3, p. S1-S4, 1994.

TURTON, Jane F. *et al.* The role of IS Aba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS microbiology letters**, v. 258, n. 1, p. 72-77, 2006.

TSAI, Feng-Chiao *et al.* Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 10, p. 1592, 2008.

VANEECHOUTTE, Mario *et al.* Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 11-15, 1995.

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.

VINCENT, Jean-Louis *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama**, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009.

VINCENT, Jean-Louis. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068-2077, 2003.

VIJAYAKUMAR, Saranya *et al.* Molecular characterization of invasive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in south India. **Infectious diseases and therapy**, v. 5, n. 3, p. 379-387, 2016.

VILEFORT, Larissa Oliveira Rocha *et al.* *Staphylococcus* sp. em profissionais de áreas de apoio de uma instituição oncológica da região Centro-Oeste. 2011.

WALSH, Christopher *et al.* **Antibiotics: actions, origins, resistance**. American Society for Microbiology (ASM), 2003.

WALSH, Timothy R. *et al.* Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALSH, Timothy R. *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases*, v. 11, n. 5, p. 355-362, 2011.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-383, 2006.

WANG, Nengding et al. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01163-14, 2014.

WANG, Yang et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature microbiology*, v. 2, n. 4, p. 1-7, 2017.

WARREN, John W. Catheter-associated urinary tract infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 4, p. 299-303, 2001. WERNER, Michael S. et al. Environmental influence on *Pristionchus pacificus* mouth form through different culture methods. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7207, 2017.

WEI, Jun-Zhi *et al.* *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. 2011.

WHO. Preventing bloodstream infections from central line venous catheters. Geneva: WHO; 2016. [Online] Disponível em: <<http://www.who.int/patientsafety/implementation/bsi/en/>> (Acesso em 28 de Setembro de 2018).

WHO. The burden of health care-associated infection world wide. 2016 [Online] Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/> (Acesso em 27 de Setembro de 2018).

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.** World Health Organization, 2017.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

WILECKI, Martin *et al.* Predatory feeding behaviour in *Pristionchus* nematodes is dependent on phenotypic plasticity and induced by serotonin. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 9, p. 1306-1313, 2015.

WORTHINGTON, Roberta J.; MELANDER, Christian. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177-184, 2013.

WRIGHT, Meredith S. *et al.* Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* using IS-seq. **Journal of bacteriology**, p. JB. 00833-16, 2017.

YIGIT, Hesna *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YOSHIMURA, Jumpei *et al.* Impact of Gram stain results on initial treatment selection in patients with ventilator-associated pneumonia: a retrospective analysis of two treatment algorithms. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 156, 2017.

XIE, Ruiqiang *et al.* Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2018.

ZARKOWER, D., **Somatic sex determination: The *C. elegans* Research Community WormBook** (2006) Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_somaticsexdeterm/somaticsexdeterm.html. Acesso em: 28/10/2018.

ZHENG, Yu-long *et al.* Risk factors and mortality of patients with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. **American journal of infection control**, v. 41, n. 7, p. e59-e63, 2013.

