



UFMG
2024 MICROBIOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada

Larissa Naneti Rosa

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E *SMALL COLONY VARIANTS* SOB
PRESSÃO DE COLISTINA EM DIFERENTES CLONES DE *ACINETOBACTER*
SPP**

Belo Horizonte

2024

Larissa Naneti Rosa

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E *SMALL COLONY VARIANTS* SOB
PRESSÃO DE COLISTINA EM DIFERENTES CLONES DE *ACINETOBACTER*
SPP**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em
Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Santiago Martín Lattar.

Belo Horizonte

2024

043

Rosa, Larissa Naneti.

Análise da formação de biofilmes e small colony variants sob pressão de colistina em diferentes clones de *Acinetobacter* spp [manuscrito] / Larissa Naneti Rosa. – 2024.

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

Orientador: Santiago Martin Lattar.

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

1. Microbiologia. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Células Clonais. 4. Biofilmes. I. Lattar, Santiago Martin. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
MESTRADO PROFISSIONAL

ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E *SMALL COLONY VARIANTS* SOB PRESSÃO DE
COLISTINA EM DIFERENTES CLONES DE *ACINETOBACTER*

LARISSA NANETI ROSA

Nº matrícula: 2022710651

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA APLICADA-MESTRADO PROFISSIONAL, área de concentração Microbiologia Aplicada, linha de pesquisa Diagnóstico Microbiológico e Epidemiologia, como requisito para a obtenção do grau de MESTRE EM MICROBIOLOGIA.

Aprovada em 09 de dezembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Santiago Martín Lattar - Orientador
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Magna Cristina de Paiva
Universidade Federal de São João del Rei
Profa. Elisabeth Neumann
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Erna Geessien Kroon
Coordenadora

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Santiago Martín Lattar, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/12/2024, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Magna Cristina de Paiva, Usuário Externo**, em 16/12/2024, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3810029** e o código CRC **874318AD**.

Aos meus pais (Liliane e João), avós (Maria Cleusa e Luzia) e avô (Milton) (in memorian), tios (Demetrius) e demais familiares que foram minha base durante essa caminhada. Ao meu namorado (Riquelme) e meu filho (João Emanuel) que me deram forças para chegar até o fim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este momento de agradecimento a todos que fizeram parte da minha jornada acadêmica e pessoal durante a elaboração deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus, cuja presença constante e apoio espiritual foram fundamentais para me guiar em cada desafio enfrentado. Sua luz iluminou meu caminho e me deu forças nos momentos de incerteza.

Aos meus pais (Liliane e João), avô (Milton, in memoriam) e avós (Luzia e Maria Cleusa), e tios, sou eternamente grata pelo amor incondicional, pela sabedoria compartilhada e pelo suporte emocional que sempre estiveram presentes. Vocês foram meu alicerce, sempre acreditando em mim e me incentivando a perseguir meus sonhos. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu namorado (Riquelme), meu companheiro e amigo, agradeço profundamente pelo carinho e pela paciência ao longo de toda essa jornada. Sua compreensão e apoio foram essenciais para que eu pudesse me dedicar a este projeto com foco e determinação, e não desistisse em meio a tempestade. E ao meu filho (João Emanuel), minha maior alegria e inspiração, agradeço por me lembrar todos os dias do que realmente importa na vida. Seu sorriso ilumina até os dias mais desafiadores.

Agradeço também ao meu grupo de pesquisa e ao pessoal do laboratório, que tornaram cada dia mais leve e cheio de aprendizado. As trocas de ideias, as risadas e a colaboração mútua foram vitais para meu crescimento e desenvolvimento. Agradeço, em especial, ao meu orientador, cuja orientação, expertise e paciência foram cruciais para me guiar por esse caminho. Sua dedicação em me ajudar a aprimorar meu trabalho e a superar obstáculos foi fundamental para a realização deste projeto.

A todos vocês, meu sincero e profundo agradecimento. Esta conquista é, sem dúvida, fruto do esforço conjunto e do amor que recebi de cada um. Muito obrigado!

*“Os dias prósperos não vêm
por acaso; nascem de
muito trabalho e
persistência”.*

Henry Ford

RESUMO

Acinetobacter baumannii é uma bactéria gram-negativa frequentemente associada a IRAS (infecções relacionadas a assistência em saúde) representando um desafio crescente na saúde pública devido à sua resistência a múltiplos antimicrobianos. *Acinetobacter baumannii* pertence ao grupo “ESKAPEE” (acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Escherichia coli*) que é composto por seis patógenos com multirresistência e virulência. Notável por sua capacidade de formar biofilmes, que são estruturas complexas de células aderidas a superfícies, e pela diversidade de clones circulantes que complicam o controle das infecções. Além disso, a formação de *Smalls colony variants* (SCVs) tem sido associada a uma maior virulência e resistência. Este trabalho tem como objetivo analisar a formação de biofilmes e a ocorrência de SCVs em diferentes clones resistentes e sensíveis de *A. baumannii*, bem como investigar a presença do gene *bap*, associado à formação de biofilmes. Os biofilmes foram desenvolvidos em condições estáticas em placas de 6 poços a 37°C por 24 h. Os resultados demonstraram que cepas de *A. baumannii* resistentes a colistina produzem maior densidade celular de biofilme [$5,02 \times 10^{11}$ UFC/mL] do que cepas sensíveis [$4,9 \times 10^{10}$ UFC/mL] ($p = 0,0173$). Inclusive, as cepas resistentes de *A. baumannii* produzem uma maior frequência de geração de SCVs [$5,4 \times 10^{-2}$] quando comparados aos isolados sensíveis [1×10^{-2}] ($p = 0,0226$). Foram identificados 3 clones de *A. baumannii*, onde o clone 2 foi capaz de gerar maior densidade de células no biofilme sob pressão de concentração subinibitória de colistina [$1,29 \times 10^{14}$ UFC/mL], quando comparado aos clones 1 e 3 [$5,22 \times 10^{11}$ UFC/mL, $1,79 \times 10^{11}$ UFC/mL] respectivamente ($p = 0,033$) e ($p = 0,021$). Ademais, a presença do gene *bap* foi observada em todos os isolados de *A. baumannii* analisados, sugerindo seu papel crucial na adesão e persistência desse patógeno. Portanto, a formação de biofilmes em *A. baumannii* com densidades celulares muito altas representa um desafio significativo para o tratamento das IRAS, e a disseminação global dos clones mundiais acentua essa problemática, o que evidencia a necessidade urgente de desenvolver estratégias eficazes de controle e prevenção, sendo crucial intensificar a pesquisa sobre os mecanismos de resistência e desenvolver novas abordagens terapêuticas, além de implementar medidas rigorosas de vigilância em ambientes de saúde.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. SCVs. Biofilmes. Diversidade clonal.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a gram-negative bacterium frequently associated with HAIs (*healthcare-associated infections*) and represents a growing public health challenge due to its resistance to multiple antimicrobials. *Acinetobacter baumannii* belongs to the “ESKAPEE” group (acronym for *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp and *Escherichia coli*) which is composed of six pathogens with multidrug resistance and virulence. Notable for its ability to form biofilms, which are complex structures of cells adhered to surfaces, and for the diversity of circulating clones that complicate infection control. In addition, the formation of *Smalls colony variants* (SCVs) has been associated with increased virulence and resistance. This study aimed to analyze the formation of biofilms and the occurrence of SCVs in different resistant and sensitive clones of *A. baumannii*, as well as to investigate the presence of the *bap* gene, associated with biofilm formation. The biofilms were developed under static conditions in 6-well plates at 37°C for 24 h. The results demonstrated that colistin-resistant *A. baumannii* strains produce higher biofilm cell density [5.02×10^{11} CFU/mL] than sensitive strains [4.9×10^{10} CFU/mL] ($p = 0.0173$). In fact, resistant strains of *A. baumannii* produce a higher frequency of SCV generation [5.4×10^{-2}] when compared to sensitive isolates [1×10^{-2}] ($p = 0.0226$). Three clones of *A. baumannii* were identified, where clone 2 was able to generate higher cell density in the biofilm under subinhibitory colistin concentration pressure [$1.29 \cdot 10^{14}$ CFU/mL], when compared to clones 1 and 3 [5.22×10^{11} CFU/mL, 1.79×10^{11} CFU/mL] respectively ($p = 0.033$) and ($p = 0.021$). Furthermore, the presence of the *bap* gene was observed in all *A. baumannii* isolates analyzed, suggesting its crucial role in the adhesion and persistence of this pathogen. Therefore, the formation of biofilms in *A. baumannii* with very high cell densities represents a significant challenge for the treatment of HAIs, and the global dissemination of clones worldwide accentuates this problem, which highlights the urgent need to develop effective control and prevention strategies, with it being crucial to intensify research on resistance mechanisms and develop new therapeutic approaches, in addition to implementing rigorous surveillance measures in health settings.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. SCVs. Biofilms. Clonal diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>A. baumannii</i> em Ágar MacConkey.....	15
Figura 2. Representação gráfica da formação de biofilme em <i>A. baumannii</i>	16
Figura 3. Cápsula de <i>A. baumannii</i>	24
Figura 4. Pilus de <i>A. baumannii</i> ATCC17978.....	25
Figura 5. Vesículas de membrana em biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 6. CIM de colistina para os isolados de <i>A. baumannii</i> ou qualquer espécie do complexo <i>ACB</i>	48
Figura 7. <i>SCVs</i> em Ágar BHI após 3 dias de incubação a 37°C.....	50
Figura 8. Padrão de bandas para <i>A. baumannii</i> e espécies do complexo <i>ACB</i> em gel de agarose 1,5%.....	52
Figura 9. Análise da presença do gene <i>bap</i> nos isolados de <i>A. baumannii</i> e complexo <i>ACB</i>	55
Figura 10. Comparação de tamanho entre colônia normal de <i>A. baumannii</i> e <i>SCVs</i> através de microscopia.....	64
Figura 11. Análise da presença do gene <i>bap</i> nos isolados de <i>A. baumannii</i> e complexo <i>ACB</i>	68
Figura 12. Padrão de bandas para <i>SCVs</i> de <i>A. baumannii</i> e espécies do complexo <i>ACB</i> em gel de agarose 1,5%.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das espécies – Grupos 1 e 2.....	53
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de colistina para os isolados de <i>A. baumannii</i> e outras espécies do complexo <i>ACB</i> – Grupo 1 e 2.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB*. 59
- Gráfico 2** - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão de concentração subinibitória de colistina..... 61
- Gráfico 3** - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão de concentração subinibitória de colistina nos diferentes clones de *Acinetobacter*..... 63
- Gráfico 4** - Análise da formação de *SCVs* de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão ou não de concentração subinibitória de colistina..... 65
- Gráfico 5** - Análise da formação de *SCVs* de *A. baumannii* e complexo *ACB* sensíveis (S) e resistentes (R) a colistina..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii – *Acinetobacter baumannii*.

ACB – *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*.

BGN – Bastonete gram-negativo.

BHI – *Brain Heart Infusion*.

CIM – Concentração Inibitória Mínima.

EPS – Substâncias exopoliméricas extracelulares.

ICLs – International clonal linhagens.

IRAS – Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde.

LPS – lipopolissacarídeos.

MDR – *Multidrug-resistant*.

PBPs – Proteínas de ligação à penicilina.

PCR – Reação em cadeia da Polimerase.

RAPD – Amplificação aleatória de polimorfismo de DNA.

SCVs – *Small Colony Variants*.

TS – Tipo Selvagem.

TSA – *Triple soy agar*.

UFC – Unidades formadoras de colônias.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

UPGMA – Método de grupo de pares não ponderado com aritmética de agrupamento de médias.

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo.

WHO – *World Health Organization*.

XDR – *Extended Detection and Response*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	15
3.1.1	Aspectos taxonômicos e características gerais.....	15
3.1.2	Epidemiologia	17
3.1.3	Formação de biofilme	19
3.1.4	Formação de <i>SCVs</i>	21
3.1.5	Outros fatores de virulência	23
3.1.6	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	32
4.	OBJETIVOS.....	38
4.1	Objetivo Geral.....	38
4.2	Objetivos específicos.....	38
5.	METODOLOGIA	39
5.1	Amostras bacterianas.....	39
5.2	Etapa laboratorial	42
5.2.1	Confirmação da espécie através da presença do gene <i>gyrB</i> pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
5.2.2	Caracterização genotípica – Amplificação aleatória de polimorfismo de DNA (RAPD).....	43
5.2.3	Análise da presença do gene <i>bap</i> , associado a formação de biofilmes nos diferentes isolados de <i>A. baumannii</i> e outras espécies do complexo <i>ACB</i>	45
5.2.4	Concentração inibitória mínima (CIM) – Microdiluição em caldo.....	46
5.2.5	Crescimento e quantificação da densidade celular dos biofilmes e formação de <i>SCVs</i>	48
5.3	Análise Estatística	51
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO.....	70
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

9. ANEXOS 106

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo gram-negativo nosocomial, não fermentador, aeróbico, imóvel, catalase positivo, oxidase negativo e não exigente (IBRAHIM, S. *et al* 2021). Cresce na maioria dos meios utilizados na rotina laboratorial, como o ágar MacConkey, ágar Sangue e triple soy agar (TSA) (TAKAGY, E. H. 2011). É ubíquo na natureza e foi encontrado como parte da microbiota, garganta e flora retal, bem como em alimentos e piolhos do corpo (GIAMARELLOU, H. *et al* 2008). Pertencente ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ACB) que compreende a espécie majoritariamente ambiental *A. calcoaceticus* e as espécies clinicamente importantes *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. dijksboorniae*, sendo *A. baumannii* a mais relevante clinicamente por apresentar um reservatório complexo de genes de resistência (ALVES, R.L. 2022).

Em seres humanos é considerado patógeno oportunista, infectando predominantemente pacientes hospitalares, especialmente em casos de pneumonia associada ao ventilador, infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário e meningite (MEA, H.J. *et al* 2021). Nos EUA, estima-se que aproximadamente 12.000 infecções por *A. baumannii* ocorram anualmente, com 500 mortes associadas a essas infecções (NASR, P. 2020). Enquanto isso, no Brasil, cerca de 70 a 80% dos isolados de *A. baumannii* de um estudo mostraram-se resistentes a carbapenêmicos, possuindo ligação com 50.000 a 100.000 mortes por infecções causadas pelos seis patógenos prioritários pela *World Health Organization* (WHO, 2017; TACONELLI, E. *et al* 2017). Desde então, surtos foram relatados em todos os principais continentes, com infecções causadas por isolados multirresistentes (MDR) chegando a 44% (MEA, H.J. *et al* 2021). Devido essa reputação, alguns órgãos como Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA), a *World Health Organization* (WHO) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da América (CDC) declararam em 2019 *A. baumannii* MDR uma ameaça crítica para a saúde global promovendo-a de um nível de ameaça “sério” para “urgente” (MEA, H.J. *et al* 2021).

A. baumannii tem vários mecanismos de resistência, incluindo a produção de enzimas β -lactamases, e modificadoras de fluorquinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas (ANVISA, 2020). Outros mecanismos não enzimáticos como bombas de efluxo, defeitos de permeabilidade e modificações de locais-alvo também estão presentes em *A. baumannii*. Esse acúmulo de

mecanismos de resistência, além da sua capacidade de formação de biofilmes, diminuiu gradualmente o número de classes de antimicrobianos disponíveis para tratar tais infecções (LEE, C.R. *et al* 2017).

O biofilme microbiano se caracteriza pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, como estratégia de sobrevivência através da produção de substâncias exopoliméricas e alterações fenotípicas das células que imobilizam e protegem as células bacterianas (YAN, J. & BASSLER, B.L. 2019). Desta forma, induz uma fraca absorção e difusão dos antimicrobianos através de sua matriz, favorecendo o processo de resistência bacteriana (ROSA, L.N. *et al* 2021). Em cepas mucoides a produção de biofilme é considerada maior, sendo o ácido algínico o principal exopolissacarídeo produzido (STAPPER *et al* 2004), enquanto que as cepas não mucoides possuem um potencial menor de formação de biofilme, e há prevalência dos exopolissacarídeos Psl e Pel (OLIVEIRA, 2018).

A formação dos biofilmes se dá por uma única espécie microbiana ou então por várias através da formação de um aglomerado de microrganismos (FERREIRA, 2013). Sua formação e desenvolvimento ocorrem em etapas, sendo elas: (i) adesão das células a superfície; (ii) maturação, onde ocorre a produção de polímeros; e (iii) reprodução celular até o desprendimento, onde pode ocorrer a liberação de células do biofilme, as quais podem voltar ao seu estado planctônico (DONLAN, 2002).

Nos biofilmes as células se comunicam através de um mecanismo denominado *quórum sensing* (QS). *Quórum sensing* refere-se a um fenômeno de comunicação celular existente em bactérias, onde ao se atingir uma certa densidade populacional mudanças no padrão de expressão gênica, e conseqüentemente da fisiologia das células são disparadas (PEREIRA, 2014). Vários componentes celulares em *A. baumannii* regulam a formação de biofilme, incluindo detecção de quorum, apêndices bacterianos e componentes de superfície bacteriana (matriz exopolissacarídica contendo proteínas e DNA). Além dos componentes celulares, sinais extracelulares específicos, como falta de nutrientes, concentração de cátions livres, pH e temperatura, afetam a formação do biofilme (CHOUDHARY, M.; SHRIVASTAVA, R.; VASHISTT, J. 2022)

Dentre as proteínas que medeiam a capacidade de *A. baumannii* formar biofilmes, há a proteína codificada pelo gene *bap*, que desempenha um papel importante na adesão intercelular, no acúmulo de células bacterianas e no estabelecimento do biofilme (ALIRAMEZANI, A. *et al* 2016). Ainda, essa proteína é altamente imunogênica, originando um aumento do nível de

anticorpos quando administradas em camundongos, podendo ser um importante alvo terapêutico (BIERHALS, C.G. *et al* 2018). Algumas observações também mostram que a proteína A da membrana externa (OmpA) de *A. baumannii* desempenha um papel parcial no desenvolvimento de biofilmes, assim como os pili, que medeiam sua fixação (YANG, C.H. *et al* 2019). Os genes são agrupados na forma de um *operon csu*, cujos produtos formam uma estrutura de feixe semelhante a pilus em *A. baumannii* (CINCAROVA, L. *et al* 2016).

Para tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* são geralmente utilizados antimicrobianos carbapenêmicos (LEE, C.R. *et al* 2017). No entanto, fatores como o aumento do número de infecções por *A. baumannii*, bem como a ampla utilização de antimicrobianos de forma irracional, têm contribuído para um crescimento na taxa de resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos utilizados na prática clínica (MOTA, F.S.; OLIVEIRA, H.A.; SOUTO, R.C.F. 2018), sendo as polimixinas e a tigeciclina opções de último recurso para tratamento de infecções por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) (LI *et al* 2006). Vários genes de resistência já foram relatados em *A. baumannii*, como algumas β -lactamases de classe A, C e D, e as metalo- β -lactamases (LEE, C.R. *et al* 2017). Além da resistência causada pela ação de enzimas, outros mecanismos, como as bombas de efluxo é considerada um importante fator de resistência bacteriana nas infecções por *A. baumannii*, já que alteram o sítio alvo de ligação do antimicrobiano (ROY, S. *et al* 2022).

Devido essa resistência, apenas algumas opções de antimicrobianos eficazes estão disponíveis para tratar infecções *A. baumannii* MDR, como as terapias combinadas, incluindo colistina/imipenem, colistina/meropenem, colistina/rifampicina, colistina/tigeciclina, colistina/sulbactam, colistina/teicoplanina e imipenem/sulbactam (LEE, C.R. *et al* 2017).

A maioria dos isolados de *A. baumannii* MDR ou XDR (extensivamente resistente a medicamentos) pertencem a dois clones disseminados globalmente, GC1 e GC2, conhecidos inicialmente como “clones europeus” e descritos pela primeira vez na década de 1970 (HOLT, K. *et al* 2016). Até os dias atuais, estudos demonstram a ocorrência de pelo menos nove clones globais bem sucedidos de *A. baumannii* (GC1-GC9) (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). A disseminação desses clones está diretamente correlacionada a resistência à múltiplos antimicrobianos, principalmente em ambientes hospitalares, onde surtos têm sido frequentes (TAKAGI, E. H. 2011).

Nove clones de *A. baumannii* já foram descritos até hoje, no entanto, dados sugerem que GC2 parece ser a linhagem clonal mais difundida e relacionada à resistência aos carbapenêmicos

(HAWKEY, J. *et al* 2018). Apesar disso, outras linhagens clonais, como GC4 e GC5 já foram descritas em países europeus, e da América do Sul (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Por sua vez, GC6, descrito pela primeira vez na Itália em 2006, apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, exceto à colistina (MAYANSKIY N. ET AL 2017; SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Os primeiros isolados da linhagem GC7 representaram o grupo mais prevalente na Bolívia e Uruguai, apesar de hoje já terem sido relatados em diferentes regiões do mundo (HIGGINGS, P. G. *et al* 2010). Enquanto isso, clones de *A. baumannii* GC8 e GC9 foram relatados como isolados únicos até então (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023; MULLER, S. C. D. 2019).

Além das diferentes linhagens clonais, *A. baumannii* está diretamente ligado a formação de *Small Colony Variants* (SCVs), que são variantes de pequenas colônias translúcidas que constituem uma subpopulação de bactérias de crescimento lento, auxotróficas com características fenotípicas e patogênicas distintas (AHMAD, I. *et al* 2019). Crescem em ágar sangue como colônias não pigmentadas ou com pigmentação pontual, e seus principais testes bioquímicos geralmente não são reativos (MELTER; RADOJEVIC, B. 2011). Clinicamente, são mais capazes de persistir em células de mamíferos e são menos suscetíveis a antimicrobianos, podendo causar infecções latentes ou recorrentes, em especial em pacientes com fibrose cística, osteomielite e infecções relacionadas ao dispositivo, como tubos endotraqueais e ventilação mecânica (PROCTOR, R.A. *et al* 2006; NOAMAN, K. A. *et al* 2023). Especialmente em *A. baumannii* a formação desse tipo de colônia está associada a variações na morfologia celular, motilidade de superfície, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e virulência (AHMAD, I. *et al* 2019), podendo causar confusão aos microbiologistas e levar à falsa identificação e falha no tratamento de infecções por SCVs (NOAMAN, K. A. *et al* 2023).

Diante do exposto, esse projeto tem como objetivo determinar a diversidade clonal, os perfis de formação de biofilme e SCVs com e sem pressão de concentrações subinibitórias de polimixina E (colistina) em isolados clínicos de *A. baumannii* e complexo *ACB* de modo a garantir dados robustos e terapias eficazes para a população com os resultados obtidos (MURRAY, C.J.L. *et al* 2022).

2 JUSTIFICATIVA

A. baumannii é um dos patógenos mais frequentemente isolados em infecções de pacientes hospitalizados, principalmente aqueles acometidos por infecções do trato respiratório, como as pneumonias, em especial aqueles que fazem uso de equipamento auxiliar para respiração, além de infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário e meningite.

A. baumannii apresenta uma grande diversidade clonal em ambientes hospitalares e também comunitários, o que é de fato uma grande preocupação de saúde pública, uma vez que a mesma vem acrescida de frequentes relatos de resistência à múltiplas classes de antimicrobianos (MDR), e também uma possível panresistência, isto é, resistência a todos antimicrobianos disponíveis no mercado (PDR). Fato esse, que foi comprovado pela WHO em 2024, onde *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos foi classificado como prioridade crítica na lista de Agentes prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos para tratamentos.

Essa resistência é muitas vezes relacionada à capacidade dos diferentes clones de *A. baumannii* formarem biofilmes, uma vez que o mesmo diminui a absorção e impede a difusão do antimicrobiano pela célula bacteriana, favorecendo então o processo de resistência. Além disso, outros mecanismos, como por exemplo, a capacidade de *A. baumannii* formar SCVs permite uma maior resistência aos antimicrobianos, já que essa subpopulação bacteriana apresenta características fenotípicas distintas que as tornam mais resistentes a certos tratamentos, como também tornam maior sua probabilidade de sobrevivência em ambientes hostis.

Diante do exposto e das altas taxas de morbidade e mortalidade causadas por infecções por *A. baumannii* (MDR) relatadas em todo o mundo, acredita-se que quanto maior for o conhecimento em torno dos perfis clonais de formação de biofilmes e SCVs, maior e mais importante se torna o conhecimento acerca das características expressas por tais cepas, favorecendo a realização de medidas eficazes não só para o tratamento correto, mas também para o controle da disseminação de clones resistentes.

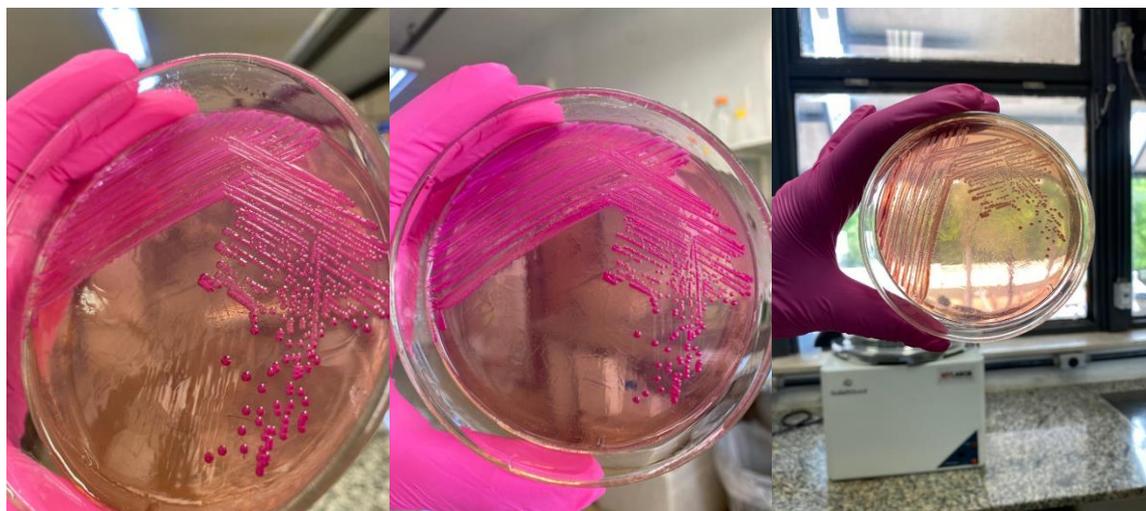
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Acinetobacter baumannii*

3.1.1 Aspectos taxonômicos e características gerais

A. baumannii é um cocobacilo gram-negativo, aeróbio, não-fermentador de glicose, oxidase negativo, catalase positivo, indol negativo, esculina negativo, não fastidioso e imóvel (SILVA, R.N.P 2019). Além de apresentar cápsula e fímbrias para adesão e formação de biofilmes (DARREN, W. *et al* 2017), é comumente encontrado em ambientes de cuidado à saúde (ABBOTT *et al* 2013; POGUE *et al* 2013), em especial em ventiladores mecânicos e máquinas de diálise, nas fontes de água, na pele e mucosas dos profissionais de saúde e doentes (SILVA, R.N.P. 2009). Seu cultivo é realizado na maioria dos meios utilizados na rotina laboratorial, como ágar sangue e chocolate formando colônias planas, por vezes mucóides, de coloração branco-acinzentada, com diâmetro variando de 1,5mm a 3mm (PELEG *et al* 2008). Em ágar MacConkey apresenta-se como não-fermentador de lactose (ABBOTT *et al* 2013).

Figura 1 - *A. baumannii* em Ágar MacConkey.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Pertencente a família *Moraxellaceae*, o gênero *Acinetobacter* surgiu em 1911, descrito por um cientista alemão, que nomeou-as como *Micrococcus calcoaceticus* (OLIVEIRA, S.C. 2015). No entanto, com o passar dos anos, novas bactérias foram descritas e classificadas em ao menos

31 espécies diferentes de *Acinetobacter*, como *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter radioresistens* e outras espécies. Recentemente, duas novas espécies foram descritas e denominadas como *Acinetobacter ursingii sp. nov.* e *Acinetobacter schindleri sp. nov.* (CANGUSSU, C. 2020). Dentre as espécies descritas, *A. baumannii* têm sido a mais encontrada em amostras clínicas, relacionada em especial as IRAS (WELBER, B.S., HARDING C.M., FELDMAN M.F. 2015). *A. baumannii* faz parte de um complexo denominado complexo *Acinetobacter calcoaceticus - Acinetobacter baumannii* (ACB), que além dela inclui outras 4 espécies, sendo elas *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter dijkshoorniae* e *Acinetobacter nosocomialis* (ROCHA, L. et al 2017), cuja capacidade de distinção entre elas é difícil através dos métodos usuais. Graças a essas dificuldades encontradas na rotina de identificação das espécies do complexo ACB, a implementação das tecnologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *gyrB*, tornou-se uma alternativa promissora (TEIXEIRA, A.B. 2013). A aplicação desse tipo de técnica possibilita resultados rápidos e de baixo custo, nos possibilitando o entendimento da prevalência e incidência dessas espécies, além de tratamento assertivo e eficaz.

Embora existam relatos de isolados ocasionais de *A. baumannii* de fontes não humanas, como animais, piolhos, vegetais, aquicultura e solos, *A. baumannii* é encontrada principalmente em ambiente hospitalar, em especial nas unidades de terapia intensiva (UTI) como grande causador de uma ampla gama de infecções nosocomiais graves, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário, meningite secundária, e em taxas mais elevadas, pneumonia associada ao ventilador e as infecções da corrente sanguínea (ANTUNES, L.C.S., VISCA, P., TOWNER, K.J. 2014).

A. baumannii possui diversos mecanismos de resistência que incluem genes de resistência a antimicrobianos, degradação enzimática de medicamentos, modificações de alvos, bombas de efluxo multidrogas, defeitos de permeabilidade e formação de biofilmes (LEE, C-R. et al 2017). Além disso, vários fatores de virulência foram identificados por análises genômicas e fenotípicas, incluindo porinas de membrana externa, fosfolipases, proteases, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares, sistemas de secreção de proteínas e sistemas quelantes de ferro (LEE, C-R. et al 2017). Graças a isso, *A. baumannii* hoje pertence ao grupo “ESKAPEE” (acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Escherichia coli*)

composto por seis patógenos com multirresistência e virulência (ZONTA, F.N.S. et al 2020). Além disso, em 2024 a WHO publicou uma lista global de bactérias com resistência a antimicrobianos que devem ter prioridade na investigação de novos fármacos para tratamento, e em primeiro lugar como prioridade crítica temos *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (WHO, 2024).

Em 2019 a resistência microbiana foi elencada como uma das dez ameaças à saúde global e atualmente mata cerca de 700 mil pessoas todos os anos por infecções não tratáveis, causadas por patógenos resistentes (ZONTA, F.N.S. et al 2020). Até 2050, a previsão é de que bactérias resistentes a antimicrobianos poderão tirar a vida de 10 milhões de pessoas ao ano, ou seja, morrerão mais pessoas por ano devido a infecções bacterianas que por câncer (ICTQ, 2023).

3.1.2 Epidemiologia

Além de ser uma espécie amplamente distribuída, a disseminação global de *A. baumannii* têm sido impulsionada por várias linhagens denominadas “clones internacionais de alto risco” (IC) ou “clones globais” (CG), descritos desde a década de 1970 (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023).

Esses clones estão muitas das vezes relacionados a surtos hospitalares, devido a tendência de *A. baumannii* estar envolvida nesses ambientes (AEDH, A. I. et al 2023). Por isso, conhecer o máximo do “inimigo”, ou seja, possuir as ferramentas para realizar efetivamente a vigilância epidemiológica, investigar a disseminação de cepas, clones ou linhagens de alto risco e elucidar os mecanismos de aquisição e transferência de resistência a antimicrobianos é fator fundamental.

Inicialmente, os clones globais carregavam genes que conferiam resistência apenas a aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclinas (HAMED, S. M. et al 2023). No entanto, com o passar do tempo e devido ao acúmulo de vários mecanismos genéticos de resistência, sublinhagens também resistentes a outros antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos, clones globais como GC1, GC2 e GC3, há muito tempo conhecidos, acumularam resistência a outros antimicrobianos (CASTANHEIRA M., MENDES, R.E., GALES, A.C. 2023).

Embora nove clones de *A. baumannii* tenham sido descritos até hoje, dados sugerem que GC2 parece ser a linhagem clonal mais difundida e relacionada à resistência aos carbapenêmicos (HAWKEY, J. et al 2018). A grande preocupação neste caso é que geralmente essa resistência

é mediada pelas β -lactamases de classe D que hidrolisam os carbapenêmicos OXA-23, OXA-24/40 e OXA-58 em *A. baumannii* (CHAN, K. W. *et al* 2022). O clone GC3, considerado um dos principais clones do passado, parece ser menos frequente, apresentando poucos relatos em todo o mundo, e relacionados a origem não humana (KLOTZ, P. *et al* 2019). Os clones GC1 e GC2 foram relatados em todos continentes, confirmando sua distribuição e afirmando sua atribuição a clones globais (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023).

Outras linhagens clonais, como GC4 e GC5 já foram descritos em países europeus, e da América do Sul, como Brasil, Argentina, Chile e Paraguai (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Curiosamente, GC5 demonstrou ter um aspecto mais amplo de determinantes de resistência antimicrobiana que GC4, visto a presença de presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e mutações nos genes constitutivos *pmrAB* que podem ser responsáveis pela menor suscetibilidade a polimixinas (ROMANIN, P. *et al* 2019; GERSON, S. *et al* 2020). Além disso, GC5, é considerado o segundo clone mais frequente, atrás apenas de GC2, e é considerado endêmico na América Latina (RAÑA-MIRAGLIA, L. *et al* 2020).

Por sua vez, GC6, descrito pela primeira vez na Itália em 2006, apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, incluindo carbapenêmicos, porém foram suscetíveis à colistina. Descrito em países europeus, Brasil e EUA, têm sua ocorrência principalmente em países como Rússia, Bielorrússia, Itália e outros da América do Sul (MAYANSKIY, N. *et al* 2017; SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Além disso, apresenta alta capacidade de formação de biofilme, maior resistência à dessecação e maior capacidade de adesão/invasão de células hospedeiras, favorecendo sua difusão e persistência (FONSECA, E.L. *et al* 2020).

Os primeiros isolados da linhagem GC7 representaram o grupo mais prevalente na Bolívia e Uruguai, apesar de já ter sido relatado em diferentes regiões do mundo, incluindo Europa, Ásia e América do Norte e do Sul (HIGGINGS, P. G. *et al* 2010). As cepas desta linhagem também demonstraram melhor aderência e uma formação de biofilme significativamente maior na ausência de antimicrobianos (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Higgings e colaboradores (2020) identificaram dois isolados GC7 que abrigavam principalmente o gene *bla*_{OXA-23} beta-lactamase entre pacientes ucranianos feridos na guerra.

Enquanto isso, clones de *A. baumannii* GC8 foram relatados como isolados únicos na Índia, Afeganistão, Alemanha, Bangladesh, China e Filipinas (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023). Em hospitais búlgaros, *A. baumannii* resistente a múltiplos

medicamentos também foi associado a disseminação de GC8, juntamente com GC1 e GC2 (HIGGINGS, P. G. 2023). Curiosamente, em isolados filipinos, o gene da carbapenemase *bla*_{NDM-6} foi encontrado exclusivamente em três genomas GC8 (CHILAM, J. *et al* 2014).

Por fim, o clone mais recentemente indentificado (GC9) em isolados de *A. baumannii* foi descrito na Bélgica, Egito, Itália e Paquistão, carregando os genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{NDM-1} e *bla*_{OXA-23}, respectivamente (MULLER, S. C. D. *et al* 2019). Outros isolados que codificam *bla*_{OXA-94}, *bla*_{NDM-1} e *bla*_{VIM-1} também foram descritos em outras regiões do mundo (Espanha, Arábia Saudita e Tunísia), o que indica que mesmo essa linhagem sendo mais específica do Oriente médio e norte da África, ela apresenta ampla distribuição global e geralmente inclui metalo-beta-lactamases (SHELENKOV, A., AKIMKIN, V., MIKHAYLOVA, Y. 2023).

Um novo candidato, GC10 já vêm sendo discutido, uma vez que dados de Shelenkov e colaboradores (2023) demonstram que a estrutura clonal de *A. baumannii* não pode ser fixada de uma vez por todas, e que essa espécie bacteriana evolui sob pressão de antimicrobianos e através de outros fatores ambientais, ocasionando na perda de importância de clones já existentes, mas também no surgimento de novos clones ainda não descritos.

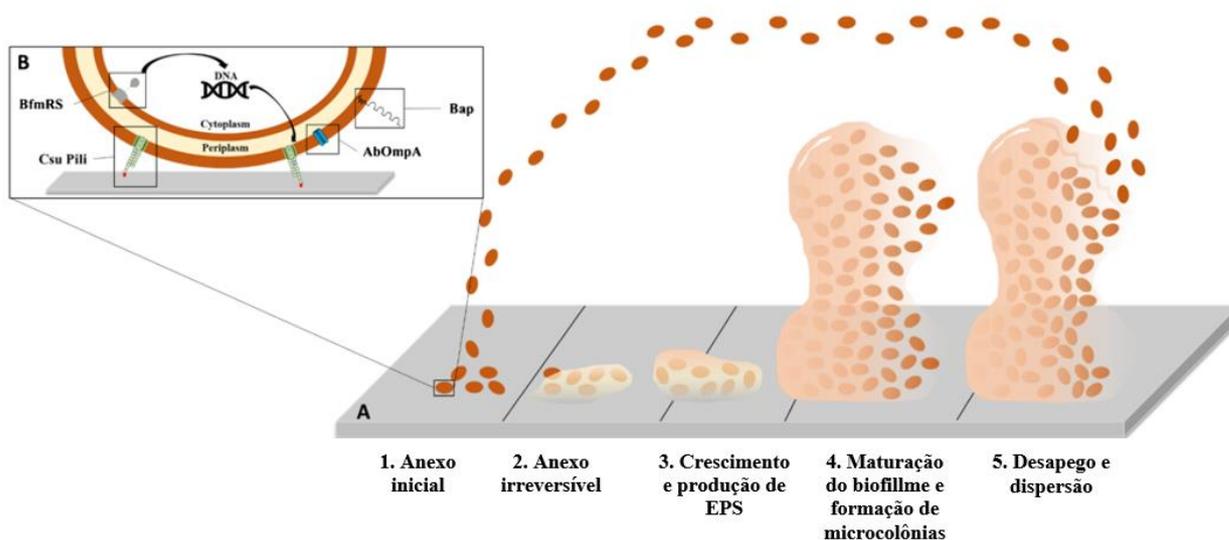
3.1.3 Formação de biofilme

Dentre todos os determinantes de virulência, a formação de biofilmes tornou-se uma das principais características patogênicas de *A. baumannii* (MOUBARECK, C.A.; HALAT, D.H. 2020).

Biofilmes são coleções de microorganismos caracterizados por células aderidas a um substrato e embedidas por uma matriz de substâncias poliméricas extra-celulares, como os exopolissacarídeos (EPS), proteínas, ácidos nucléicos e outras substâncias (CABRAL *et al* 2011). Sua função nada mais é que fornecer à bactérias um meio de sobreviverem a ambientes agressivos, a resistir a ação de antimicrobianos e também a variabilidade de pH, radiação UV, temperaturas extremas, dessecação, falta de nutrientes e imunidade do hospedeiro (HOYLE & COSTERTON, 1991). O modo de crescimento do biofilme pode aumentar a resistência antimicrobiana (RAM) por um determinado patógeno em até 1000 vezes (MENDES, S.G. *et al* 2023). A partir disso, existe uma diversidade de mecanismos que cooperam para uma RAM elevada em biofilmes, como por exemplo, as interações com antimicrobianos, que podem alimentar a transferência horizontal de genes (LOCKHART, J.S., BURET, A.G., MORCK,

D.W. 2020). Essa transferência é muitas das vezes relacionada a exposição a concentrações inibitórias sub-mínimas (sub-CIMs) de antimicrobianos (MENDES, S. G. *et al* 2023).

Figura 2 - Representação gráfica da formação de biofilme em *A. baumannii*.



Fonte: Adaptado de Mendes *et al.*, 2023.

<https://doi.org/10.1007/s10096-023-04677-8>

Alguns autores já demonstraram que cerca de 80-98% dos isolados de *A. baumannii* são produtores de biofilme (KRZYŚCIAK, P. *et al* 2017). Em outro estudo, realizado com 100 isolados clínicos de *A. baumannii*, pode-se observar que todos apresentaram capacidade de formar biofilme, e inclusive, 58% destes apresentaram alta capacidade de formação (ZEIGHAMI, H. *et al* 2019). Além disso, outro estudo realizado por Rao (2008) também revelou que 68% dos isolados de *A. baumannii* eram produtores de biofilme.

Segundo Espinal, Marti & Vila (2011) e Greene e colaboradores (2016) células formadoras de biofilme de *A. baumannii* clinicamente isoladas foram capazes de sobreviver à dessecação por um tempo duas vezes maior que quando comparadas com suas células não formadoras de biofilme. Conseqüentemente, observou-se que o biofilme de *A. baumannii* está presente em diversos dispositivos médicos, como cateteres, tubos endotraqueais de respiradores, frascos de tubos de diálise, aço inoxidável e superfícies de policarbonato (GADDY & ACTIS 2009; GREENE *et al* 2016). Outro estudo, descobriu que, apesar da dessecação e da falta de nutrientes, cinco cepas clínicas isoladas de *A. baumannii* mantiveram a virulência em superfícies como

plástico, vidro e até mesmo jalecos de laboratório (CHAPARTGUI-GONZÁLEZ *et al* 2018). Com tal persistência hospitalar, é natural que *A. baumannii* seja o responsável por inúmeros surtos de infecções por bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares (HING, J.; MEA, P.V.C.; YONG, E.H.W. 2021).

São vários os genes que podem estar relacionados a formação de biofilmes em *A. baumannii*, dentre eles o de maior importância é o gene *bap*, uma vez que, após a ligação inicial a superfícies abióticas e a montagem dos *pili*, ocorre a síntese da proteína de adesão à superfície da proteína associada ao biofilme (BAP), que desempenha um papel significativo na iniciação e maturação do biofilme (GADDYS, J.A.; ACTIS, L.A. 2009). Em um estudo realizado por Azizi e colaboradores (2016), após análise molecular e expressão do gene *bap*, observou-se que 64% dos isolados com atividade de biofilme forte a moderada continham o gene.

3.1.4 Formação de SCVs

As *Smalls Colony Variants (SCVs)* são uma subpopulação bacteriana de crescimento lento (geralmente precisam de 48 a 72 horas para se tornarem visíveis em placas de ágar), formada sob uma certa pressão seletiva, incluindo pH extremo, estresse pelo frio, limitação nutricional, exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos ou desinfetantes e localização ou sobrevivência nas células hospedeiras (TUCHSCHERR, L.; LOEFFLER, B.; PROCTOR, R.A. 2020). Trata-se de colônias pequenas (geralmente 10 vezes menor que a cepa do tipo selvagem), com estabilidade fenotípica variável, caracterizadas pela redução de sua pigmentação (SENDI, P.; PROCTOR, R. A. 2009).

Sua ocorrência está muitas vezes relacionada a infecções crônicas e recidivantes, como osteomielite, infecções relacionadas ao dispositivo e infecções por fibrose cística (FC) (ZHOU, S. *et al* 2022). Além disso, as *SCVs* apresentam resistência aumentada a muitos antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e ciprofloxacino (TUCHSCHERR *et al* 2020; ZHENG *et al* 2021). Mesmo com tamanha preocupação, sabe-se que as *SCVs* não são totalmente reconhecidas entre os profissionais de saúde. Inclusive, o uso de procedimentos laboratoriais padrão de rotina para detectar *SCVs* é difícil devido às características fisiológicas, metabólicas e morfológicas atípicas dessas colônias (KAHL, B.C.; BECKER, K.; LÖFFLER, B. 2016). Além disso, testes de diferenciação (coagulase, catalase e testes bioquímicos) e sistemas de identificação comerciais são dificultados pela diminuição do

metabolismo dessas variantes, e consequentemente produzem resultados falso-negativos (KAHL *et al* 1998; KAHL, B.C. 2014).

Durante os últimos anos, a incidência de SCVs foi relatada não apenas em diversos tipos de infecções clínicas humanas, como também na medicina veterinária (ATALLA *et al* 2008) e em campos da microbiologia alimentar (KARATZAS *et al* 2007; ONYANGO *et al* 2007). Apesar de não descrita sua ocorrência em *A. baumannii*, sua formação parece ser um mecanismo natural de sobrevivência de muitas espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella*, *Enterococcus faecalis* e *E. coli* (KAHL, B.C. 2014).

Sabe-se até então que os mecanismos mais avançados que levam ao fenótipo de SCVs são aqueles descritos para SCVs dependentes de hemina e menadiona, que surgem após tratamento com aminoglicosídeos (KOHLENER *et al* 2003; BALWIT *et al* 1994; KAPLAN e DYE, 1976; PELLETIER *et al* 1979; MILLER *et al* 1978). Outros mecanismos incluem, SCVs dependentes de timidina, SCVs com auxotrofismo de CO₂, SCVs induzidas dentro de células eucarióticas, SCVs induzidas por quinolonas, SCVs induzidas por triclosan, SCVs induzidas por estresse pelo frio e SCVs induzidas por alta pressão hidrostática (HHP) (KAHL, B.C. 2014). Inclusive, outra característica importante deste grupo é que algumas SCVs podem ser distinguidas pela suplementação com um substrato específico num meio quimicamente definido, ou seja, sua suplementação pode causar ou não a reversão do crescimento para seu fenótipo normal (KAHL, B.C. 2014).

Dentro da biologia molecular, vários estudos já analisaram a expressão e transcrição de importantes genes de virulência e reguladores de SCVs e os compararam com fenótipos isogênicos normais, e todos eles foram caracterizados por uma regulação negativa do ciclo do TCA e do regulador global *agr* (VON EIFF *et al* 2006; KOHLER *et al* 2003; SEGGEWISS *et al* 2006; KRIEGESKORTE *et al* 2011; MOISAN *et al* 2006).

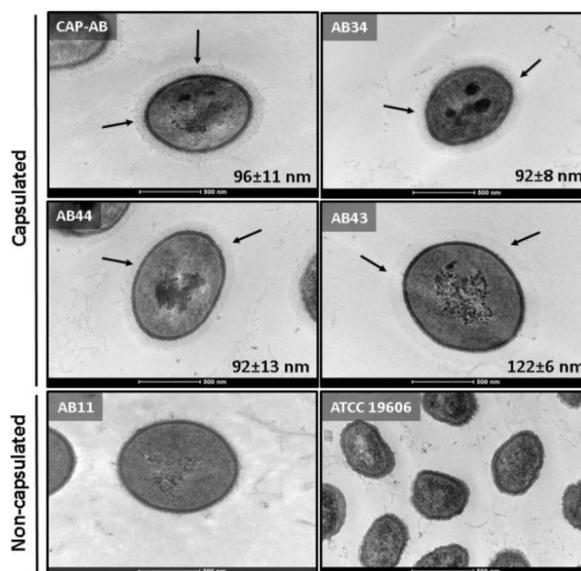
Um fato comum e marcante das SCVs é a sua ligação com o aumento da formação de biofilme, conforme mostrado para SCVs dependentes de hemina e menadiona (MITCHELL *et al* 2008; MITCHELL *et al* 2010). Todas essas características descritas anteriormente levam à redução da virulência das SCVs, mas a uma capacidade aumentada de infecção persistente (KAHL, B.C. 2014), uma vez que SCVs que se encontram no interior das células hospedeiras sem provocar uma forte resposta do hospedeiro, funcionam como um reservatório para infecções persistentes, conforme descrito por Tuchscher e colaboradores (2010).

São limitadas as opções de tratamento para infecções por *SCVs*. Isso graças às características especiais das *SCVs* com baixa taxa metabólica e replicação lenta, além de sua resistência aos antimicrobianos (KAHL, B.C. 2014). Em um estudo onde foi realizada uma comparação sistemática de agentes anti-estafilocócicos dirigidos contra as *SCVs* de *Staphylococcus aureus* e seus fenótipos normais, pode-se observar a potência e eficácia de determinados antimicrobianos contra as *SCVs*, sendo as fluorquinolonas, moxifloxacina e a oritavancina os antimicrobianos que demonstraram melhores resultados para a morte intracelular de *SCVs* de *S. aureus* (NGUYEN *et al* 2009). Outras substâncias como as fluoroquinolonas e a tomatidina, um produto vegetal, inibiram a replicação de *SCVs* (IDELEVICH *et al* 2011; MITCHELL *et al* 2011).

3.1.5 Outros fatores de virulência de *A. baumannii*

3.1.5.1 Cápsula

A cápsula é um dos principais determinantes de virulência em *A. baumannii* (figura 3). Composta por unidades de açúcar repetitivas e bem embaladas que criam uma barreira contra condições ambientais, como secura e desinfecção, e reações do sistema imunológico, como fagocitose (MOUBARECK, C.A.; HALAT, D.H. 2020). Além de proteger contra a ação de alguns antimicrobianos (GEISINGER, E.; ISBERG, R.R. 2015).

Figura 3 - Cápsula de *A. baumannii*.

Fonte: adaptado de *BMC Microbiol* 20, 285 (2020), <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01971-9>.

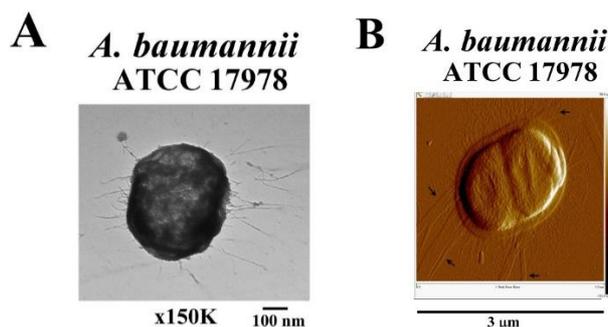
Legenda: O halo que circunda as células dos isolados capsulados representa a cápsula (setas pretas).

3.1.5.2 Fímbrias

A.baumannii é capaz de formar estruturas de superfícies, como os *pili* (figura 4), que desempenham papel importante na adesão a superfícies bióticas e abióticas, facilitando a formação do biofilme bacteriano, a colonização do hospedeiro e invasão (HOMENTA, H. *et al* 2014).

Os *pili* em bactérias gram-negativas são classificados em cinco famílias diferentes com base na maquinaria de biogênese: (i) os *pili* tipo IV, (ii) os *pili* de secreção tipo IV conjugativos, (iii) fibras curli, (iv) os *pili* tipo V, e (v) o *pili* do acompanhante-apresentador (CU) (RAMEZANALIZADEH, F.; OWLIA, P.; RASOOLI, I. 2020). Quatro agrupamentos de genes que codificam *pili* tipo I foram identificados em *A. baumannii*, destes, o agrupamento *csu* (A1S_2213-2218) que codifica *Csu pilus*, é responsável pela fixação e a formação de biofilme em superfícies abióticas, enquanto os *pili* tipo IV estão envolvidos na motilidade de espasmos (AHMAD, I. *et al* 2023).

Figura 4 - Pilus de *A. baumannii* ATCC 17978.



Fonte: *Journal of Microbiology, Immunology e infection*, v.55, i.1, p.69-79, 2022,

<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.01.008>.

3.1.5.3 Indução de morte celular em células eucarióticas

As infecções bacterianas podem provocar diversas respostas no hospedeiro, como por exemplo a morte celular eucariótica, que pode se manifestar de diferentes formas, sendo elas apoptose, necrose ou piroptose (COSTA, P.S. 2017).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, não-inflamatória, ATP-dependente, e morfologicamente caracterizada por uma vesiculação da membrana plasmática, encolhimento celular, condensação da cromatina, e fragmentação nuclear (HOSSAIN & FAKRUDDIN, 2012).

A apoptose celular pode ser desencadeada por duas vias diferentes, a via intrínseca (mediada pela mitocôndria) e a via extrínseca (mediada via receptor) (FRANÇA, R.O. 2015). Durante o processo apoptótico, acontece um importante fato, que é a externalização da fosfatidilserina, um componente dos fosfolípídeos da face interna da membrana plasmática, que redistribui-se e se externaliza para fora da membrana nas fases iniciais da apoptose, atuando como um sinalizador celular (COSTA, P.S. 2017). Para a detecção da fosfatidilserina na superfície das células, a anexina A5 juntamente com o iodeto de potássio (IP) podem ser utilizados como um ligante marcador, uma vez que ela se liga fortemente e especificamente a fosfatidilserina durante o processo de morte celular, e também para determinar se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas (ZHANG *et al* 2013; COSTA, P.S. 2017).

Diversas são as espécies bacterianas que têm sido relatadas como indutoras de apoptose, devido a diferentes mecanismos, que incluem a produção de toxinas bacterianas ou a expressão de fatores de patogenicidade que interagem diretamente com os compostos-chave da maquinaria

celular (RUMBO *et al* 2014). Krzyminska e colaboradores (2012) apresentaram evidências de que linhagens do complexo *ACB* induzem apoptose em células epiteliais, através de adesão às células e através de citotoxicidade mediada pelo contato.

A. baumannii é capaz de promover a apoptose de células eucarióticas, uma propriedade atribuída à atividade de OmpA, que quando transferida para mitocôndria e núcleos, induz as vias de morte celular eucariótica através da liberação do citocromo C (BONIN, R.F. 2011). Juntamente, uma resposta imune é mediada por Th1, que regula a síntese de óxido nítrico indutível (iNOS) através de uma via mediada pelo receptor Toll-like (TLR)-2 (GORDON e WAREHAM, 2010). Além disso, essa proteína OmpA está envolvida também na adesão e invasão de células epiteliais interagindo com a fibronectina do hospedeiro, e se ligando ao fator H no soro humano, permitindo que *A. baumannii* sobreviva ao sistema de complemento (SILVA, L.C.A. 2022).

Por outro lado, a necrose caracteriza-se como um processo acidental, acompanhado de processo inflamatório e não depende de ATP. Além disso, ocorre através da ruptura da membrana, inchaço e liberação de conteúdo intracelular. Pode ser acionada por sinais de perigo, como desestabilização lisossomal, liberação de calpaínas e depleção de ATP, geralmente induzidos por infecções bacterianas (COSTA, P.S. 2017).

Enquanto isso, a piroptose assemelha-se a apoptose, uma vez que trata-se de um mecanismo programado, coordenada pelo inflamassoma e acompanhada pela ruptura da membrana, fragmentação do DNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e IL-18 (COSTA, P.S. 2017). A piroptose é desencadeada a partir de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que são reconhecidos por proteínas NLR, que iniciam o processo de montagem do inflamassoma para ativar caspase-1 (ASHIDA *et al* 2011).

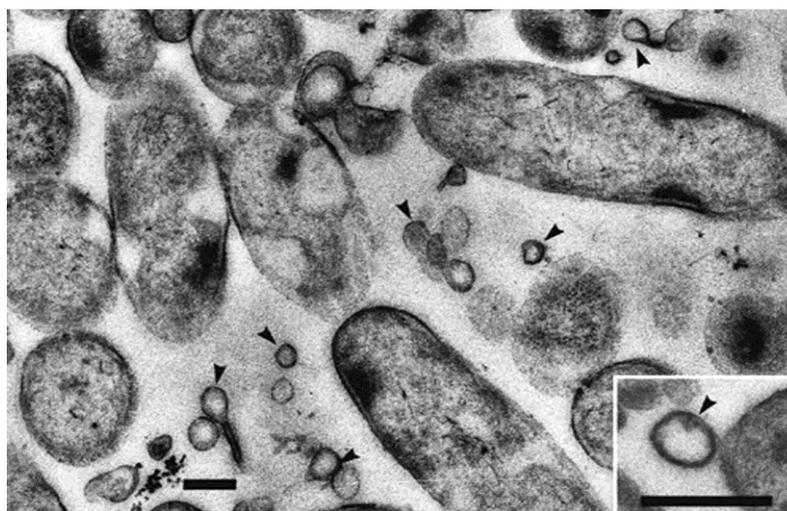
3.1.5.4 Vesículas

Muitas espécies bacterianas gram-negativas demonstram habilidade de secretar vesículas de membrana externa (OMVs) durante o crescimento bacteriano. Essas vesículas aprisionam vários componentes periplasmáticos, como as proteínas de membrana externa (OMPs), atuando como veículo para o transporte dessas moléculas até o tecido das células hospedeiras (JIN *et al* 2011).

Como vários desses componentes são fatores de virulência, como os lipopolissacarídeos, as proteínas de membrana externa, proteínas periplasmáticas, proteínas citoplasmáticas e o DNA ou RNA, as OMVs são essenciais durante o estabelecimento da infecção, por concentrar e transportar essas moléculas (ZUSHENG LI, CLARKE, A.J., BEVERIDGE, T.J. 1998). Segundo Bonin (2011) 26 OMPs derivadas de OMVs já foram identificadas em *A. baumannii*, como AbOmpA, responsável por sua aderência e invasão nas células epiteliais.

As OMVs possuem um papel essencial no contexto dos biofilmes. O modo de crescimento dos biofilmes determina que diferentes espécies de bactérias vivam próximas umas das outras, compartilhando diferentes processos metabólicos, tornando-se dependentes umas das outras (BEVERIDGE *et al* 1997). Além disso, de acordo com Bonin (2011) a acumulação de certas OMPs está associada a habilidade de *A. baumannii* produzir quantidades significativas de biofilme.

Figura 5 - Vesículas de membrana em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: *FEMS Microbiol Rev*, v. 20, I. 3-4, 1997, p. 291–303.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x>

Quando em contato com o sítio-alvo nas células-alvo, o conteúdo dessas OMVs pode ser liberado e desencadear processos bioquímicos por meio de três mecanismos descritos: i) lise proximal, difusão e internalização, ii) fusão, iii) endocitose (MANNING & KUEHN, 2010). No primeiro mecanismo, as OMVs sofrem uma lise espontânea, permitindo a difusão de seu conteúdo, e por conseguinte, sua internalização na célula-alvo (LOPES, A. S. 2017). Já no

mecanismo de fusão, observou-se que o conteúdo das vesículas foi diretamente depositado em células-alvo e estava presente na membrana externa de bactérias e células hospedeiras (KADURUGAMUWA & BEVERIDGE, 1999). O terceiro mecanismo, trata-se da endocitose de células eucarióticas, que resulta na entrada total das OMVs para o interior das células (KULP & KUEHN, 2010).

Uma observação interessante realizada por Manning e Kuehn (2011) foi o aumento da taxa de liberação de OMVs em resposta à ação de antimicrobianos que atuam diretamente na membrana externa de bactérias gram-negativas, diminuindo sua concentração no momento da ação contra as bactérias.

Portanto, as OMVs podem ser consideradas um mecanismo bacteriano de resposta ao estresse (GARCIA, M.W. 2018). No entanto, outros fatores – secreção, transporte, aquisição de nutrientes – também desempenham papel importante para o estabelecimento e manutenção deste mecanismo de defesa e resistência bacteriana (KULKARNI e JAGANNADHAM, 2014).

3.1.5.5 Proteínas de membrana externa (porinas)

As porinas (OMPs) são proteínas de membrana externa que agem como canais de entrada transportando moléculas para o interior da célula bacteriana (PEREIRA, D.C.R. 2013). Estas desempenham múltiplas funções, atuando por exemplo, como alvos potenciais para a adesão a outras células e também na ligação de compostos bactericidas à superfície de bactérias gram-negativas (FRANÇA, R.O. 2015).

A. baumannii têm em si poucas porinas quando comparadas a outras espécies gram-negativas, o que explica de certa forma sua resistência antimicrobiana intrínseca (PEREIRA, D.C.R. 2013). Essas proteínas não somente influenciam na virulência de *A.baumannii*, mas também desempenham um papel significativo nos mecanismos de resistência (FRANÇA, R.O. 2015). Por exemplo, reduções na expressão de porinas podem favorecer a resistência a novos antimicrobianos, uma vez que levam a degradação enzimática de fármacos como carbapenêmicos e cefalosporinas (LAVIGNE *et al* 2013; POULOU *et al* 2013; BAROUD *et al* 2013).

Em *A. baumannii* a principal OMP é uma proteína monomérica, nomeada OmpAb ou HMP-AB (“*Heat-modifiable protein*”), pertencente à família OmpA-like (PEREIRA, D.C.R. 2013). A

proteína HMP-AB é a maior porina descrita em *A. baumannii*. Esta porina possui cerca de 35 kDa, e permite a entrada de β -lactâmicos e sacarídeos para o interior da célula bacteriana (ANTUNES, J.B. 2018).

Segundo Lin e colaboradores (2014), diversos estudos identificaram um número de OMPs envolvidos na resistência a carbapenêmicos em *A.baumannii*. Observou-se que a perda de uma proteína de membrana externa de 29kDa, mais tarde descrita como CarO, contribui para a resistência ao imipenem (MUSSI *et al* 2007; CATEL-FERREIRA *et al* 2011). Mais tarde, Catel-Ferreira e colaboradores (2012) constataram que OprD oferece sítios de ligação específicos para a ligação de íons de ferro e magnésio, permitindo a adaptação de *A. baumannii* ao estresse. Enquanto isso, Tiwari e colaboradores (2012) observaram que OmpW de 21 kDa estava envolvida na resistência a carbapenêmicos em isolados resistentes de *A. baumannii*.

Apesar de todos estudos e dados obtidos, sabe-se atualmente que a diminuição da expressão de porinas por si só não é suficiente para causar resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, mas sim quando ocorre em simultâneo a outros mecanismos, como bombas de efluxo e produção de carbapenemases (ANTUNES, J.B. 2018).

3.1.5.6 Sistema de aquisição de micronutrientes

A aquisição de micronutrientes como ferro, zinco e manganês é essencial para a espécie *A. baumannii*, pois é importante para a interação patógeno-hospedeiro, na reprodução bacteriana e conseqüentemente no sucesso da patogênese (LAW; TAN, 2022).

O ferro é um micronutriente essencial para que as bactérias infectem e multipliquem nos tecidos e fluidos corporais do hospedeiro. Em mamíferos, o ferro geralmente encontra-se ligado a proteínas como transferrina, lactoferrina, e ferritina, limitando dessa forma sua disponibilidade sérica (HASAN; CHOI; OH, 2015). No entanto, *A. baumannii* consegue driblar essa reação do hospedeiro através da produção de acinetobactina, principal sideróforo da espécie, e que possui como função a obtenção de ferro por meio de sua quelação (KATSUBE *et al* 2017; KIM *et al* 2021). Além disso, *A. baumannii* expressa vários genes relacionados a aquisição de ferro, como o *basA-J* que são responsáveis pela síntese desses sideróforos, *barA/B* que realizam o efluxo e *bauF* responsável pela captação do ferro após sua quelação (CONDE-PÉREZ *et al* 2021).

O zinco (Zn) funciona como um catalisador para reações enzimáticas. O mecanismo para aquisição de zinco de alta afinidade (ZnuABC) é regulado pelo regulador de captação de zinco (Zur) (NAIRN *et al* 2016). Quando os níveis intracelulares de zinco encontram-se baixos ou então há a presença da calprotectina, Zur permite a captação e a liberação do complexo zinco-histidina (His-Zn), que se transforma na forma biodisponível através da ação de ZigA e histidina amônia liase (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

O manganês (Mn) é utilizado como um cofator redox ativo para enzimas (SILVA, M.C.B. 2022). Vários são os transportadores de Mn já descritos em células bacterianas, sendo que os mais conhecidos são os transportadores de cassete de ligação de Mn ATP (ABC) e a família de proteínas de macrófagos associados à resistência natural (NRAMP) de transportadores de Mn (JUTTUKONDA; CHAZIN; SKAAR, 2016). Já se sabe que *A. baumannii* utiliza uma ação combinada de importação de manganês e metabolismo da ureia, porém, o mesmo não foi completamente elucidado (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

De forma geral, a restrição bacteriana a esses compostos leva a inibição do crescimento bacteriano e redução de sua virulência (OLIVEIRA, W.S. 2023).

3.1.5.7 Sistema de secreção de proteínas

Os microrganismos possuem sistemas de secreção de proteínas que transportam substâncias do exterior para o interior do seu organismo, como também do interior para o exterior (CUNHA, J.P.N. 2019). Em *A. baumannii*, a secreção de proteínas através de estruturas de superfície celular é essencial para sua interação com o ambiente e com os tecidos do hospedeiro, tornando-se um alvo potente para o desenvolvimento de antimicrobianos e vacinas (GRANDI, G. 2010).

Os sistemas de secreção *Type 1 secretion system (T1SS)*, *Type 2 secretion system (T2SS)*, *Type 5 secretion system (T5SS)* e *Type 6 secretion system (T6SS)* são os principais sistemas de secreção de proteínas identificados na espécie *A. baumannii* (CUNHA, J.P.N. 2019; HARDING, C.M. *et al* 2017).

O T1SS é um sistema tripartite formado por transportador de ligação de ATP, proteína de fusão à membrana e componente de membrana externa (CUNHA, J.P.N. 2019). Em *Acinetobacter* spp. T1SS é homólogo ao sistema prototípico TolC-HlyD-HlyB de *E. coli* para exportação da hemolisina HlyA, e sua função é secretar efetores desdobrados diretamente do

citoplasma para o ambiente extracelular (KORONAKIS, V. *et al* 2000; HARDING, C.M. *et al* 2017).

O T2SS é um complexo multiproteico, composto por 12 a 15 proteínas, compreendendo quatro subconjuntos: um pseudopilus, um conjunto de plataforma de membrana interna, um complexo de membrana externa e uma secreção ATPase (CAMPOS, M. *et al* 2013; CUNHA, J.P.N 2019). Sua funcionalidade é a exportação de proteínas do espaço periplasmático para o meio extracelular ou para a superfície externa de muitas bactérias gram-negativas, como *A. baumannii* (SANDKVIST, M. 2001).

O T5SS é o sistema de secreção mais simples e mais difundido em microrganismos gram-negativos (CUNHA, J.P.N. 2019), sendo importante para a formação de biofilmes, ligação a proteínas da matriz extracelular/membrana basal e adesão de células de *A. baumannii* ao colágeno tipo IV, bem como para a sobrevivência da espécie em um modelo murino de infecção (BENTANCOR, L.V. *et al* 2012).

O T6SS é o sistema de secreção mais exaustivamente estudado em *Acinetobacter* sp. e funcionalmente identificado em *A. nosocomialis*, *A. baumannii*, e *A. baylyi* (WEBER, B.S. *et al* 2013). Em *A. baumannii*, T6SS é necessário para sua virulência (REPIZO, G.D. *et al* 2015).

De forma geral, os sistemas de secreção de proteínas são importantes para patogênese bacteriana graças a seu papel na biologia e na virulência de membros clinicamente relevantes do complexo *ACB*, como a espécie *A. baumannii*.

3.1.5.8 Fosfolipases

A fosfolipase é uma enzima lipolítica essencial para o metabolismo dos fosfolipídios e é um fator de virulência em muitas bactérias (FLORES-DIAZ, M. *et al* 2016). Em *A. baumannii*, quatro classes de fosfolipases (A1, PLP, PLC e PLD) foram identificadas (STAHL, J. *et al* 2015).

Estas fosfolipases diferem no tipo de reação que catalisam (FIESTER, S.E. *et al* 2016). A fosfolipase A1 cliva especificamente os fosfolipídios através da hidrólise da ligação acil éster graxo na posição *sn* -1 da porção glicerol (ISTIVAN, T.S., COLOE, P.J. 2006), as PLP são hidrolases acil lipídicas inespecíficas que clivam a ligação acil éster de um fosfolipídeo (RYDEL, T.J. *et al* 2003), as PLC são enzimas que clivam o grupo principal fosforilado do

fosfolipídeo, enquanto as PLD são transfosfatidilase que apenas clivam depois do fosfato (LEE, C-R. *et al* 2017).

De acordo com Jacobs e colaboradores (2010) a interrupção de um dos dois genes PLD presentes em cepas de *A. baumannii* resultou na redução da resistência ao soro humano, na diminuição da capacidade de invasão de células epiteliais e na diminuição da virulência em um modelo murino de pneumonia. Sabe-se ainda que, muitas das fosfolipases codificadas em *A. baumannii* ATCC 19606 tem possíveis implicações na citólise e na liberação final de conteúdo intracelular rico em ferro (FIESTER, S.E. *et al* 2016). Além disso, um estudo demonstrou que de forma específica o papel de uma fosfolipase C e uma fosfolipase D tem sido associado à atividade citolítica da linha celular epitelial do carcinoma hipofaríngeo FaDu e à sobrevivência sérica e à invasão em células BEAS-2B epiteliais brônquicas humanas e células HeLa, respectivamente (CAMARENA, L. *et al* 2010; JACOBS, A.C. *et al* 2010).

Em conjunto, essas observações evidenciam em *A. baumannii* um envolvimento na citotoxicidade e na invasão de células epiteliais, assim como sugerem um papel potencial na virulência dessa espécie.

3.1.6 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

3.1.6.1 Produção de beta-lactamases

Os antimicrobianos beta-lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos – compartilham uma estrutura (anel beta-lactâmico) e um mecanismo de ação onde ocorre a inibição da síntese da parede celular bacteriana, através da inibição da última etapa da síntese de peptidoglicanos (GOODMAN&GILMAN, 2019). São várias as aplicações terapêuticas dos beta-lactâmicos, assim como os mecanismos de resistência associados a seu uso indiscriminado, onde uma cepa sensível pode adquirir resistência por meio de mutações, que reduzem a afinidade das PLPs (proteínas ligadoras de penicilina) pelo antimicrobiano, ou até mesmo resultar em alterações nos canais de porina específicos responsáveis pela difusão do fármaco pela célula bacteriana (FARIAS, D.V. *et al* 2022).

Um dos mecanismos mais importantes de resistência a antimicrobianos em *A. baumannii* é a produção de enzimas beta-lactamases, cujos genes são geralmente transportados em elementos

genéticos móveis (LEUNGTONGKAM, U. *et al* 2018). As beta-lactamases, segundo Ambler (1980) são agrupadas em quatro classes com base na sequência de aminoácidos, incluindo: A, B, C e D (ANTUNES, N.T., FISHER, J.F. 2014). Inclusive, a ampla distribuição de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB) devido a diversos mecanismos genéticos foi documentada (IBRAHIM, M.E. 2019).

As beta-lactamases de classe A possuem um grupo serina no sítio de ação, e por isso levam o nome de serino-beta-lactamases. Essa classe engloba as penicilinases, a maioria das beta-lactamases de espectro estendido (“Extended-Spectrum β -Lactamases” - ESBL), e as serino-carbapenemases (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” - KPC). Entre as enzimas já relatadas em *A. baumannii*, têm-se TEM-1, TEM-2, TEM-92, SHV-1, SHV-5, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-15, SCO, PER-2, VEB-1 e CARB, e algumas carbapenemases, como GES-14 e KPC-2 (ANVISA, 2020).

As enzimas de classe B são chamadas de metalo-beta-lactamases (MBLs). São caracterizadas por apresentarem um ou dois átomos de zinco em seu sítio de ação, e são capazes de hidrolisar grande parte dos beta-lactâmicos, possuindo alta atividade contra os carbapenêmicos, além de possuírem resistência aos inibidores de beta-lactamases, como sulbactam e clavulanato (SOARES, C.R.P. 2022). Alguns dos genes MBLs já evidenciados em *A. baumannii* são aqueles que codificam as enzimas NDM-1, GIM, SIM, SPM, IMP-1, IMP-10 e VIM (ANVISA, 2020).

Por sua vez, as enzimas da classe C são denominadas como AmpC beta-lactamase. Inclusive, a superexpressão de uma cefalosporinase cromossômica do tipo AmpC, também chamada de ADC (cefalosporinase derivada de *Acinetobacter*), pode ser o mecanismo mais comum de resistência aos beta-lactâmicos, e gera um fenótipo de resistência à ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima e ceftazidima (GENTELUCI, G.L. 2020).

As β -lactamases de classe D ou oxacilinases (OXA) possuem uma serina em seu sítio de ação. Essas enzimas OXA podem ser classificadas em oito subgrupos distintos, dos quais OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-40-like, OXA-51-like e OXA-58-like e OXA-143-like foram identificados em *A. baumannii* a nível cromossomal (IBRAHIM, M.E. 2019). Outras enzimas já encontradas na espécie são OXA-37, OXA-64, OXA-65, OXA-67 OXA-69, OXA-70, OXA-88, OXA-120, OXA-132 e OXA-219 (LEE, C.R. *et al* 2017; ANVISA, 2020), sendo OXA-23 beta-lactamase e OXA-51 beta-lactamase as enzimas mais comuns encontradas em *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB) (IBRAHIM, M.E. 2019).

3.1.6.2 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, canamicina, estreptomicina, paromomicina e neomicina) são antimicrobianos inibidores de síntese protéica que se ligam ao ribossomo bacteriano (MURRAY, 2014). São utilizados para tratar infecções graves por bactérias gram-negativas aeróbicas, como em casos de meningite por *A. baumannii* resistente a beta-lactâmicos (GOODMAN&GILMAN, 2019).

Um dos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* são as modificações de enzimas que afetam as proteínas no ribossomo bacteriano, conferindo uma resistência marcante a sua ação (TEWARI *et al* 2018). Essas modificações são ocasionadas pela ação de três classes principais de enzimas modificadoras de antimicrobianos: acetiltransferases (AAC) (3)-Ia (aacC1), fosfotransferases (APH) (3')-Via (aphA6) e nucleotidiltransferases (ANT) (2'')-Ia (aadB) e ANT(3'') -Ia (aadA1) (CUNHA, J.P.N. 2019). Os genes que codificam essas enzimas podem ser adquiridos por meio da troca de plasmídeos, transposons ou integrons de classe 1, podendo atuar sozinhos ou em combinação com outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos (EICHENBERGER & THADEN 2019).

As enzimas aminoglicosídeo-acetiltransferases causam a acetilação dos grupos -NH₂ dos aminoglicosídeos nas posições 1, 3, 2' e 6' usando acetil coenzima A como substrato doador (VETTING, M.W. *et al* 2005). Já as enzimas aminoglicosídeo-fosfotransferases fosforilam os grupos hidroxila presentes na estrutura dos aminoglicosídeos nas posições 4, 6, 9, 3', 2'', 3'' e 7'' com a ajuda do ATP (WRIGHT, G.D.; THOMPSON, P.R. 1999). Por fim, as enzimas aminoglicosídeo-nucleotidiltransferases são classificadas em 5 grupos, e transferem um grupo AMP do ATP para um grupo hidroxila nas posições 2'', 3'', 4', 6 e 9 da molécula de aminoglicosídeo (SHAW, K. *et al* 1993).

Estudos demonstram que, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) e bombas de efluxo são as principais fontes de resistência aos aminoglicosídeos entre os isolados de *A. baumannii*, onde seus genes que codificam esses mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos podem ser distribuídos como elementos móveis (KISHK, R. *et al* 2021). Inclusive, a associação de enzimas com bombas de efluxo são muito comuns e geralmente são codificadas pelo operon *adeabc* (ANVISA, 2020).

3.1.6.3 Mutações em genes cromossômicos de fluorquinolonas

As fluorquinolonas (ciprofloxacino, delafloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino e ofloxacino) são antimicrobianos bactericidas que têm como alvo a *DNA-girase* (gram-negativas) e a *topoisomerase IV* (gram-positivas) (GOODMAN&GILMAN, 2019). São amplamente utilizadas para tratar infecções graves do trato urinário, prostatite, infecções sexualmente transmissíveis, infecções gastrintestinais e abdominais, infecções respiratórias e infecções dos ossos, articulações e tecidos moles (ALÓS, J-I. 2009).

Em *A. baumannii*, o principal mecanismo de resistência envolve mutações nos genes cromossômicos (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*) que codificam a DNA-girase e a topoisomerase IV, ou ainda por transporte ativo do fármaco para fora da bactéria, o que denomina-se bomba de efluxo (ANVISA, 2020). Também já foi descrita a resistência mediada pelos genes *qnrS*, *qnrA* e *qnrB* (HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. 2015; VENKATARANAMA, G.P. *et al* 2022).

As bombas de efluxo apresentam alta frequência em *Acinetobacter* spp., destacando-se o sistema de efluxo AdeABC e AdeM, também responsável pela resistência aos aminoglicosídeos, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim, cefotaxima e tetraciclina (POOLE, 2004).

3.1.6.4 Mutações no sistema de dois componentes PmrA/PmrB das polimixinas

As polimixinas (polimixina B e polimixina E (colistina)) representam um grupo de antimicrobianos elaborados por cepas de *Bacillus Polymyxa* (MENDES, C.A.C.; BURDMANN, E.A. 2009). É uma das classes antimicrobianas mais antigas, desenvolvida a mais de 50 anos, e logo em seguida descomercializada devido seus efeitos tóxicos. No entanto, com o surgimento de microorganismos gram-negativos multirresistentes, sua volta ao mercado e a terapia clínica foi necessária.

Seu mecanismo de ação se baseia na sua interação com os fosfolipídeos causando uma desorganização na estrutura das membranas celulares bacterianas (GOODMAN&GILMAN, 2019). Seu uso é condicionado a diversos tipos de infecções (pneumonias, queimaduras, infecções ósseas, infecções ginecológicas, meningite, fibrose cística, endocardite e bacteremia) em especial as otites, porém, limitado a infecções graves por patógenos resistentes a outras

terapias efetivas, como *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (ROSA, L.N. *et al* 2021; OMS, 2017; RODRIGUES, A.P.F. 2016).

Embora a resistência a polimixinas ainda seja pouco relatada, seu aparecimento já foi relatado e documentado em diversos artigos a nível mundial, causando preocupação e uma problemática envolvendo principalmente os gêneros *Acinetobacter* e *Klebsiella* (ANVISA, 2020). Sua resistência está associada a mutações no sistema de dois componentes PmrA/PmrB, com consequente modificação do lipídeo A, através de várias substituições, deleções e inserções de nucleotídeos em todos seus três genes biossintéticos (*lpxA*, *lpxC* ou *lpxD*) que causam mudanças de quadro ou resultam em proteínas truncadas que prejudicam a biossíntese do lipídeo A (NOVOVIC, K.; JOVCIC, B. 2023), levando a perda completa ou modificações do LPS, alvo principal das polimixinas (OLAITAN, A.O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.M. 2014).

Além disso, em 2015, foi descrito pela primeira vez um mecanismo de resistência mediado por plasmídeo, o gene *mcr-1* em isolados de *E. coli* na China (DOI&CARVALHARES, 2017). Desde então, diversas variantes do gene *mcr* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*) já foram descritos, o que ocasionou grande preocupação, devido ao maior e mais rápido potencial de disseminação deste gene entre diversas espécies bacterianas (DOI & CARVALHARES, 2017).

No Brasil, o primeiro caso de *mcr-1* detectado em humanos ocorreu no estado do Rio Grande do Norte, em uma cepa de *E. coli* (OLIVEIRA, F.A. 2020). E apesar da grande diversidade de genes *mcr* já descritos, a grande maioria dos relatos no Brasil estão relacionados ao *mcr-1* (RAU, R.B. *et al* 2019). No entanto, outras variantes de *mcr*, como o *mcr-3* e *mcr-5* já foram descritas (KIEFFER, N. *et al* 2018; FERNANDES, M.R. *et al* 2018). Neste sentido, a resistência à colistina mediada por plasmídeos codificada por genes *mcr* foi reconhecida como um importante impulsionador da rápida disseminação por transferência horizontal de genes entre bactérias gram-negativas, incluindo *A. baumannii* (KHUNTAYAPORN, P.; THIRAPANMETEE, K.; CHOMNAWANG, M.T. 2022).

3.1.6.5 Sistemas de bombas de efluxo

As bombas de efluxo são denominadas como uma classe de transportadores envolvidos na captação de nutrientes e íons, na excreção de produtos produzidos pelas células bacterianas, e nos processos de comunicação entre as células (MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT,

T. 2001). São compostos por proteínas de membrana externa, associada a uma proteína de membrana interna, que têm como função proteger as células de efeitos tóxicos. Em determinadas situações, podem ser hiperexpressas e contribuir para a resistência aos antimicrobianos, ejetando uma quantidade significativa desses fármacos para fora da célula bacteriana, impedindo sua atividade (PISSULIN, C.; SIQUEIRA, C.; GIRARDELLO, R. 2021).

Dentro do sistema de bombas de efluxo há seis famílias que o compõem: superfamília cassete de ligação de ATP (ABC), superfamília dos facilitadores principais (MSF), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família de baixa resistência multidrogas (SMR) e superfamília dos transportadores de drogas e metabólitos (DMT) (PISSULIN, C.; SIQUEIRA, C.; GIRARDELLO, R. 2021).

Em *A. baumannii*, a resistência aos antimicrobianos está associada as famílias MFS e RND, onde a última consiste em um sistema tripartido, denominado AdeABC, e está associada a resistência a aminoglicosídeos, betalactâmicos, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina, sob controle de um sistema regulatório com dois componentes, codificado pelos genes *adeRS* (GORDON et al 2010; RUZIN et al 2007). Segundo Oliveira (2015), outro sistema RND já foi caracterizado em *A. baumannii*, denominado AdeIJK. Este sistema possui especificidade de substrato, favorecendo compostos anfífilos e contribuindo sinergisticamente com AdeABC para a resistência à tigeciclina (FRANÇA, R.O. 2015). Outro estudo ainda cita que, pelo menos nove sistemas tenham sido descritos em *A. baumannii*, no entanto, os sistemas tripartidos AdeABC, AdeFGH e AdeIJK foram os principais associados à perda de susceptibilidade aos antimicrobianos (JIMENEZ-CASTELLANOS, J-C., et al 2023).

A família de transportadores MSF é a segunda mais importante em relação a *A. baumannii*, onde um número de bombas de efluxo incluindo TetA, CmlA, MdfA, CrA e AmvA, que medeia a resistência a diferentes tipos de antimicrobianos já foram caracterizadas (LIN et al 2014). Entre esses antimicrobianos, a resistência à tetraciclina (TetA e TetB) e à monociclicina (TetB), assim como o sistema CmlA, o qual expulsa o cloranfenicol foram relatadas (HUYS et al 2005; FOURNIER et al 2006).

Ainda em *A. baumannii*, outro estudo relata a presença de mais duas famílias (MATE e SMR) relacionadas a sua resistência (FRANÇA, R.O. 2015). Nesse sentido, uma bomba pertencente à família MATE, denominada como AbeM foi identificada em isolados clínicos de *A. baumannii* conferindo resistência a fluoroquinolonas e imipenem (DENG et al 2014). Além disso, de acordo com Abdi e colaboradores (2020), a superexpressão desta bomba resulta em um

incremento de mais de 4 vezes nas CIMs de ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, gentamicina, triclosan, daunorrubicina, doxorrubicina, brometo de etídio e rodamina 6G. Além disso, gera um aumento reprodutível de 2 vezes nas CIMs de canamicina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprima e tetrafenilfosfônio (TPPCI) (SU, X.Z. *et al* 2005).

Outros genes pertencentes as famílias ABC e SMR relacionados a resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* também já foram relatados (ABDI, S.N. *et al* 2020). Apesar de que em bactérias gram-negativas, existem apenas casos raros de bombas de efluxo de medicamentos da família ABC. Enquanto isso, em um estudo sobre uma suposta bomba de efluxo de drogas da família SMR, codificada cromossomicamente, denominada AbeS, de uma cepa de *A. baumannii* multirresistente, demonstrou que a deleção do gene *abeS* em *A. baumannii* confirmou seu papel na resistência deliberada a estes complexos (SRINIVASAN, V.B.; RAJAMOHAN, G.; GEBREYES, W.A. 2009).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar os perfis de formação de biofilmes e formação de *SCVs* com e sem pressão de concentrações subinibitórias de colistina em diferentes clones de *Acinetobacter* spp.

4.2 Objetivos específicos

- Confirmar a identificação da espécie *A. baumannii* através da presença do gene *gyrB* pela técnica de PCR;
- Determinar a diversidade clonal de todos os isolados através da amplificação de segmentos de DNA pela técnica de PCR-RAPD;
- Determinar a concentração inibitória mínima de colistina (CIM) de todos os isolados;
- Quantificar a densidade celular dos biofilmes de todos os isolados;
- Analisar a formação de *SCVs* com e sem pressão de concentrações subinibitórias de colistina em diferentes clones de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB*;

- Determinar a presença do gene *bap*, associado a formação de biofilmes em diferentes isolados de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB*;
- Confirmar a espécie das *SCVs* por meio da presença do gene *gyrB* pela técnica de PCR.

5. METODOLOGIA

5.1 Amostras bacterianas

a) Amostras – Grupo 1

A obtenção dos isolados deste grupo (n=24) foi aprovada pelo Comitê de Ética CAAE – 01402312.6.0000.5149 (ANEXO I) através de solicitação do Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr e da Prof.^a Dr.^a Simone Gonçalves dos Santos para realização de projeto anterior (“Fatores de virulência e resistência de amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*: caracterização fenotípica e genotípica e análise da interferência destes fatores na evolução e resolução dos processos”) realizado por França e colaboradores (2015).

Neste estudo, foram analisados 24 isolados de *A. baumannii* recuperados a partir de amostras clínicas, sendo elas, ponta de catéter (36%), aspirado traqueal (28%), hemocultura (24%), urocultura (8%) e ferida operatória (4%) de pacientes internados no HC-UFGM, no período de Março de 2012 a Março de 2013, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Para a inclusão e exclusão dos participantes neste estudo, foram utilizados os seguintes critérios, respectivamente: “idade \geq 18 anos e isolamento de *A. baumannii* (em culturas clínicas e em swabs de vigilância); quando o isolamento de *A. baumannii* que motivou a potencial inclusão no estudo tivesse ocorrido antes da internação hospitalar, para pacientes do grupo de estudo, e pacientes já colonizados por bastonetes gram-negativos não-fermentadores, provenientes de outras instituições”.

• Identificação das amostras – Grupo 1

A identificação dos isolados foi feita pelo Setor de Microbiologia do HC-UFGM seguindo a metodologia padronizada no laboratório. Os isolados que foram identificados como *A. baumannii*

foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular de Microorganismos (LBCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde foram estocadas em freezer a -80°C , no meio líquido *Broth Heart Infusion* (BHI-DIFCO®) acrescido de 15% de glicerol até o início desta pesquisa.

Para a confirmação das espécies do complexo *ACB*, França e colaboradores (2015) realizaram a detecção genotípica do gene *blaOXA51*, sabidamente marcador da espécie, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, na qual se detectou ainda a presença de outras oxacilinas (*blaOXA23*, 24, 58), de acordo com a metodologia padronizada no laboratório.

• Perfil de Suscetibilidade – Grupo 1

Todos os isolados foram submetidos a detecção da concentração inibitória mínima (CIM) pelos métodos de *Epsilonometer test* (E-test®) no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios contra os seguintes antimicrobianos apresentando o respectivo perfil de resistência: Ampicilina/Sulbactam (61,3%), Ceftazidime (71%), Gentamicina (24,2%), Meropenem (98,4%), Polimixina B (0%) e Tigeciclina (48,4%). Os pontos de corte utilizados foram os definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014) e pela *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC, 2014).

b) Amostras – Grupo 2

A obtenção dos isolados deste grupo (n=18) foi aprovada segundo Carta de Anuência do Núcleo de Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG (Processo nº 2270.01.0027733/2019-80 – ANEXO II) através de solicitação da Prof.^a Dr.^a Cristina Sanches e Prof.^a Dr.^a Magna Cristina de Paiva para a realização de projeto anterior (“Resistência aos carbapenêmicos e investigação do efeito sinérgico baseado na minociclina em isolados de *Acinetobacter baumannii*”) realizado por Castro e colaboradores (2021).

Neste estudo, foram analisados 18 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos recuperados a partir de amostras clínicas, sendo elas secreção de pele (39,13%), secreção traqueal (30,43%), ponta de catéter (13,04%), urina (8,69%), sangue (4,34%) e líquor (4,34%)

de pacientes internados no Hospital João XXIII durante o ano de 2019, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

- **Identificação das amostras – Grupo 2**

Para a identificação fenotípica do complexo *A. baumannii* foi utilizado o sistema automatizado Vitek 2® (bioMérieux, França) na instituição de origem. Para a confirmação da espécie *A. baumannii* foi utilizada metodologia de espectrometria de massas - *Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), de acordo com as instruções do fabricante na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A cepa *A. baumannii* American Type Culture Collection (ATCC) 19606 foi utilizada como controle dos testes.

Os isolados bacterianos devidamente identificados, após verificação da pureza em Ágar Mueller-Hinton (Himedia, Índia), foram armazenados a -20 °C em 2 mL de caldo 68 nutriente (CN, Micromed, Brasil) acrescido de 20% de glicerol (Dinâmica, Brasil) no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ).

- **Perfil de Suscetibilidade – Grupo 2**

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (amicacina – AMI, ampicilina/sulbactam- APS, gentamicina- GEN, piperacilina-tazobactam- PPT, cefuroxima – CFX, cefoxitina- CFO, ceftazidima- CFT, ceftriaxona- CFR, cefepima- CPM, ciprofloxacina–CIP, imipenem- IMP, meropenem- MER e tigeciclina- TIG) foi determinado utilizando o sistema automatizado Vitek 2® (bioMérieux, França) e interpretado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) no Laboratório de Microbiologia do Hospital João XXIII, BH-MG.

Para os compostos meropenem (MER) (Aspen, Brasil), polimixina B (B-POL) (Sigma-Aldrich, USA), polimixina E (colistina) (COL) (USP Reference Standard Colistin Sulfate, MD, USA), ciprofloxacina (CIP) (Fagron, Brasil) e minociclina (MIN) (Sun Pharmaceutical, Índia) foram determinadas as CIMS (concentrações inibitórias mínima) exatas pela técnica de microdiluição em caldo seguindo as orientações do CLSI (2019).

As faixas de concentração testadas dos antimicrobianos variou de 1-1024 µg/mL para MER e CIP; 0,03- 32µg/mL para COL e B-POL e 0,25-256 µg/mL para MIN.

Todos os 23 isolados deste estudo foram classificados como carbapenêmicos-resistente.

5.2 Etapa laboratorial

5.2.1 Confirmação da espécie através da presença do gene *gyrB* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a confirmação das espécies do complexo *ACB*, todos os isolados incluídos neste estudo (Grupo 1 e 2) foram submetidos a uma PCR no LBCM – ICB/UFMG, de acordo com as condições definidas por Higgings e colaboradores (2007) para detecção do gene *gyrB* utilizando os primers sp4F (5'-CACGCCGTA AGAGTGCATTA), sp4R (5'-AACGGAGCTT GTCAGGGTTA) e sp2F (5'-G TTCCTGAT CCGAAATTCTCG) a 56°C de anelamento e produzindo uma banda de 294pb (sp4F a sp4R) para *A. baumannii* e outras espécies, e uma segunda banda de 490 pb (sp2F a sp4R) originária apenas de *A. baumannii*, levando a confirmação da espécie (HIGGINGS, P.G. et al 2007). Como controle positivo foi utilizada *A. baumannii* ATCC 19606.

a) Extração do DNA bacteriano

Para a extração do DNA dos isolados de *A. baumannii*, foram preparados inóculos bacterianos a partir da adição de 2-3 colônias crescidas em ágar BHI (Titan Biotech LTD., India) a um volume de 5mL de caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan). Os mesmos foram submetidos a incubação *overnight* a uma temperatura de 37°C. Após incubação iniciou-se o processo de extração de DNA de acordo com o protocolo de Seratti e Maniglia (2019), com algumas modificações.

b) Preparo do Master-Mix

Para preparo do Master-Mix foram utilizados: 2,5uL de buffer (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (10x), 0,5uL de Taq DNA polimerase (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (5Utaq/uL), 0,5uL de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (NeoTaq, Brasil) (10mM) e 0,75uL de MgCl₂ (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (50mM), 0,5μL de cada um dos primers sp4F, sp4R e sp2F (Metabion International AG, ESP) (10mM) e 14,25uL de água de injeção, seguindo o proposto por Higgings e colaboradores (2007), com algumas modificações. Cada reação ocorreu com um volume final de 25μL sendo 20uL de Master-Mix + 5uL de DNA bacteriano extraído.

c) Condições para amplificação

As condições de amplificação foram feitas de acordo com Higgings e colaboradores (2007), com algumas modificações.

Após a PCR, os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Life Technologies, Inc., USA) por 30 minutos a 100 volts usando buffer TBE 1x (HIGGINGS *et al* 2007). Finalmente, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e observado sob luz UV.

Todas as amostras positivas para *A. baumannii* ou qualquer espécie do complexo *ACB* foram utilizadas nas etapas subsequentes.

5.2.2 Caracterização genotípica – Amplificação aleatória de polimorfismo de DNA (RAPD)

A caracterização genotípica foi feita pela técnica de amplificação aleatória de polimorfismo de DNA (RAPD) usando o primer DAF4 (5'-CGGCAGCGCC-3') (Integrated DNA Technologies, IDT, USA) com uma temperatura de anelamento de 50 °C, considerando as condições descritas (GRUNDMANN, H. J. *et al* 1997; WIEDMANN-AL-AHMAD, M., TICHY, H.V., SCHON, G. 1994; RAVI, N.S. *et al* 2018; GAL, Z. *et al* 1996), com algumas modificações.

a) Preparo do Master-Mix

Para preparo do Master-Mix foram utilizados: 3uL de Taq DNA polimerase (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (1Utaq), 4uL de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (NeoTaq, Brasil) (5mM), 5uL de MgCl₂ (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (50mM), 1uL de Tris-HCl (Vetec, Brasil) (Merck, Brasil) (1M), 5uL de KCl (Vetec, Brasil) (1M), 2uL de DMSO 100% (Labsynth, Brasil), 10µL de cada um dos primers DAF4 (IDT, EUA) (10mM) e 50uL de água de injeção (GRUNDMANN, H. J. *et al* 1997; WIEDMANN-AL-AHMAD, M., TICHY, H.V., SCHON, G. 1994; RAVI, N.S. *et al* 2018; GAL, Z. *et al* 1996). Cada reação ocorreu com um volume final de 100uL sendo 80uL de Master-Mix + 20uL de DNA bacteriano extraído.

b) Condições para amplificação

As condições de amplificação foram definidas de acordo com os autores (GRUNDMANN, H. J. *et al* 1997; WIEDMANN-AL-AHMAD, M., TICHY, H.V., SCHON, G. 1994; RAVI, N.S. *et al* 2018; GAL, Z. *et al* 1996), com algumas modificações.

Após a PCR, os resultados das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Life Technologies, Inc., USA), seguindo o método proposto por (GRUNDMANN, H. J. *et al* 1997; WIEDMANN-AL-AHMAD, M., TICHY, H.V., SCHON, G. 1994; RAVI, N.S. *et al* 2018; GAL, Z. *et al* 1996), com algumas modificações.

A análise dos clones foi realizada usando o método de grupo de pares não ponderados com médias matemáticas, e a relação foi calculada usando o coeficiente Dice baseado em banda com uma tolerância de banda de 1,5% e configuração de otimização de 1,5% para o perfil inteiro usando o *software* PyElph 1.4 que possibilita a análise das bandas diretamente do gel de agarose (PAVEL A. B., VASILE C. I., 2012). Um valor de 85% foi escolhido como o limite para o estabelecimento da relação clonal das linhagens (PAVEL A. B., VASILE C. I., 2012).

5.2.3 Análise da presença do gene *bap*, associado a formação de biofilmes nos diferentes isolados de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB*

Para análise da presença do gene *bap* foi realizada uma PCR usando o primer F (ATGCCTGAGATACAAATTAT) (Integrated DNA Technologies, IDT, USA) e primer R (GTCAATCGTAAAGGTAACG) (Integrated DNA Technologies, IDT, USA) com uma temperatura de anelamento de 60 °C, considerando as condições descritas (AZIZI, O. *et al* 2016), com algumas modificações.

c) Preparo do Master-Mix

Para preparo do Master-Mix foram utilizados: 2,5uL de buffer (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (10x), 1uL de Taq DNA polimerase (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (1Utaq), 1uL de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (NeoTaq, Brasil) (5mM), 2uL de MgCl₂ (Biotecnologia e Serviços, pht, Brasil) (50mM), 1μL de cada um dos primers R e F (Integrated DNA Technologies, IDT, USA) (10mM) e 11,5uL de água de injeção (AZIZI, O. *et al* 2016). Cada reação ocorreu com um volume final de 25uL sendo 20uL de Master-Mix + 5uL de DNA bacteriano extraído.

d) Condições para amplificação

As condições de amplificação foram definidas de acordo com o autor (AZIZI, O. *et al* 2016), com algumas modificações.

Após a PCR, os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (Life Technologies, Inc., USA) por 30 minutos a 100 volts usando buffer TBE 1x (AZIZI, O. *et al* 2016). Finalmente, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e observado sob luz UV.

5.2.4 Concentração inibitória mínima (CIM) – Microdiluição em caldo

Todos os isolados do Grupo 1 foram submetidos a uma microdiluição em caldo para a determinação da CIM para colistina (Antibióticos do Brasil LTDA) seguindo as orientações do BrCast (2023). Os isolados do Grupo 2 foram isentos do teste uma vez que, em estudo anterior de Castro e colaboradores (2021) a CIM para colistina já havia sido determinada.

a) Preparo do antimicrobiano colistina

A solução do antimicrobiano colistina (0,125ug/mL) foi preparada (ISO 20776-1; CLSI (2019)), aliqüotada em soluções estoques em microtubos (2 mL), envoltos em papel alumínio e armazenados em freezer a -20°C até a realização do experimento. A escolha do antimicrobiano foi baseada nas opções terapêuticas utilizadas para tratamento das infecções clínicas por *A. baumannii* MDR (RODRIGUEZ *et al* 2015; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

b) Preparo dos inóculos

Para a determinação da CIM exata foram preparados inóculos (5×10^5 UFC/mL) através da adição de 10 uL (inóculo estoque armazenado a -20°C) a 5mL de caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan) *overnight*. Em seguida, 100uL desse inóculo foi submetido a uma diluição seriada (10^{-8}), com posterior plaqueamento (diluições 10^{-7} e 10^{-8}) para contagem das UFC/mL. A partir desse valor, cálculos descritos abaixo foram realizados de modo a conhecer o volume adequado de cada inóculo para a realização da CIM, de forma que sua concentração final fosse de 5×10^5 UFC/mL, de acordo com o proposto pelo BrCast (2023).

Fator de correção (FC) para UFC = contagem das UFCs x diluição na qual foi realizada a contagem

UFC da placa x n (volume a ser adicionado de cada inóculo) = 5mL x (5×10^5 UFC/mL)

c) Preparo da placa de 96 poços

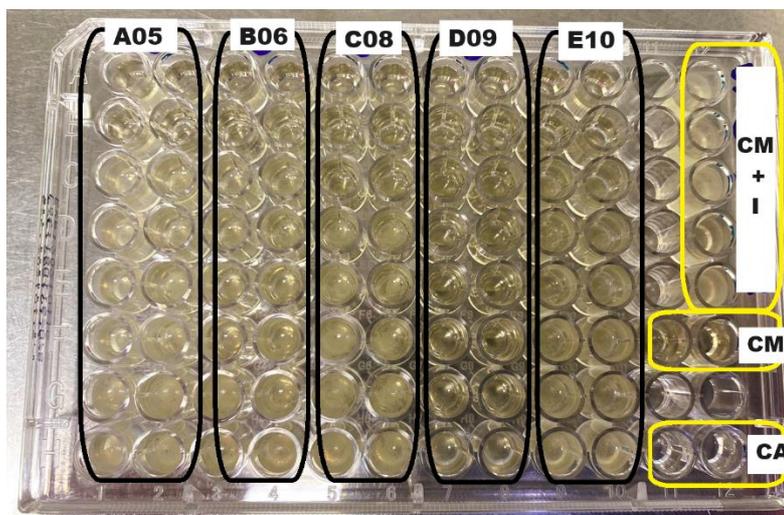
Volumes conhecidos, obtidos através de fórmula descrita acima, de cada um dos isolados foram adicionados aos poços de uma microplaca de poliestireno com fundo em “U” de 96 poços contendo o antimicrobiano (colistina) a ser testado (20 µL) previamente diluídos em caldo Mueller-Hinton (Fluka Analytical, US) (100µL), resultando em um volume final de 200 µL em todos os poços. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37° C por 24h.

Os experimentos foram realizados em duplicata, de modo a garantir uma maior reprodutibilidade dos resultados. Os controles de crescimento (meio mais inóculo), controle de esterilidade do meio (somente meio), e controle de esterilidade do antimicrobiano (somente colistina) foram realizados.

d) Interpretação dos resultados

O resultado foi avaliado pela inspeção visual da turbidez das suspensões depositadas nos poços (figura 6), o que indica crescimento bacteriano. A CIM foi considerada a menor concentração do antimicrobiano onde não foi observado o crescimento visível de *A. baumannii* ou qualquer espécie do complexo *ACB*. As faixas de concentração testada do antimicrobiano colistina variou de 0,25 - 32µg/mL.

Figura 6 – Concentração inibitória mínima de colistina para os isolados de *A. baumannii* ou qualquer espécie do complexo *ACB*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Legenda: Destacados em preto alguns dos isolados de *A. baumannii* deste estudo (A05, B06, C08, D09 e E10); em amarelo encontram-se os controles: CM+I (controle do meio + inóculo), CM (controle de esterilidade do meio) e CA (controle de esterilidade do antimicrobiano).

5.2.5 Crescimento e quantificação da densidade celular dos biofilmes e formação de SCVs

A análise de crescimento dos biofilmes dos isolados presentes no estudo foi realizada por meio da quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) após microdiluição seriada e plaqueamento em ágar BHI (Titan Biotech LTD., India) conforme proposto por Campos e colaboradores (2016), com algumas modificações.

a) Preparo dos inóculos

Para preparo dos inóculos, 10uL de todos os isolados foram adicionados em 5mL de caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan) e incubados a 37°C *overnight*. 100uL de cada um dos inóculos foi submetido a uma diluição seriada (10^{-8}). 100uL de cada uma das duas últimas diluições (10^{-7} e 10^{-8}) foram inoculadas em placas de ágar BHI (Titan Biotech LTD., India) e incubadas a 37°C por 24h.

Após incubação, realizou-se a contagem das UFC de cada um dos isolados, bem como a observação de sua pureza. A partir desse valor, cálculos foram realizados, de modo a conhecer o volume adequado de cada um dos inóculos necessário para a realização das etapas subsequentes compreendendo uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

b) Formação de biofilmes em placas de poliestireno 6 poços

Para a análise da formação dos biofilmes, concentrações padronizadas (1×10^6 UFC/mL) de cada um dos inóculos foram aplicadas em placas de poliestireno com 6 poços (Kasvi, China). Em cada um dos poços contendo a suspensão, foram adicionados 3mL de caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan). Utilizou-se como controle negativo o caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan) sem inóculo bacteriano e, como controle positivo, *A. baumannii* ATCC 19606. Incubou-se as placas a 37°C por 24 horas.

Após incubação, realizou-se com o auxílio de uma pipeta a remoção de bactérias planctônicas de cada um dos poços. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS 1X, desprezando o produto da lavagem. Finalmente, foi adicionado 1 mL de PBS e foi realizada uma fricção contra as paredes dos poços para que houvesse a liberação das células do biofilme. O produto da fricção foi então submetido a uma microdiluição seriada (10^{-8}) e 100uL dos produtos obtidos nos eppendorfs com as diluições 10^{-7} e 10^{-8} foram submetidos ao plantio em Ágar BHI (Titan Biotech LTD., India), e incubados por 24 horas a 37°C.

Após incubação, realizou-se a contagem das UFC obtidas na placa por meio de contagem manual e a interpretação dos resultados. Fator de correção foi aplicado para a diluição em que foi realizada a contagem, de acordo com cálculo abaixo:

$$\underline{\text{Contagem das UFC} \times \text{diluição no qual foi realizada a contagem} = n \text{ de UFC total}}$$

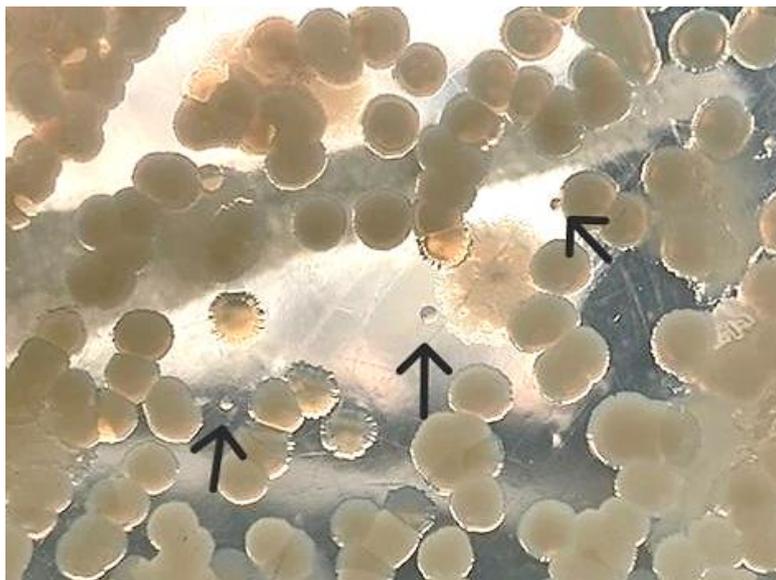
c) Crescimento e quantificação das SCVs

Todas as placas anteriormente submetidas a quantificação dos biofilmes foram re-incubadas a 37°C por um período de 7 dias. Procedeu-se com a investigação das SCVs no terceiro e sétimo dia de incubação, se sugestivo, realizou-se o isolamento da colônia para confirmação da espécie através da análise da presença do gene *gyrB*.

As *SCVs* foram identificadas a partir do seu fenótipo de crescimento em ágar BHI (figura 7), de acordo com critérios definidos: (i) colônias isoladas ~ 10 vezes menores que o fenótipo WT *A. baumannii* e (ii) crescimento lento (visível a partir de 48 horas de incubação).

Fatores de correção para contagem das *SCVs* foram aplicados para a diluição encontrada.

Figura 7 – *Smalls colony variants* de *A. baumannii* em Ágar BHI após 3 dias de incubação a 37°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

d) Crescimento e quantificação das *SCVs* com pressão antimicrobiana de colistina

Para a quantificação das *SCVs* através de pressão antimicrobiana de colistina, concentrações padronizadas ($1,0 \times 10^6$ UFC/mL) de cada um dos inóculos foram aplicadas em placas de poliestireno com 6 poços (Kasvi, China) contendo 3mL de caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan). Utilizou-se como controle negativo o caldo BHI (Neogen Corporation, Michigan) sem inóculo bacteriano e, como controle positivo, *A. baumannii* ATCC 19606. Por fim, incubou-se as placas a 37°C por 24 horas.

Após incubação, concentração subinibitória de colistina definida através da CIM dos isolados (0,125ug/mL) foi adicionada em cada um dos poços, e novamente as placas foram incubadas a 37°C por 24h. A concentração subinibitória de colistina foi definida através da metade do valor da menor CIM encontrada para os isolados deste estudo.

Posteriormente, realizou-se com o auxílio de uma pipeta a remoção de bactérias planctônicas de cada um dos poços. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS 1X, desprezando o produto da lavagem. Finalmente, foi adicionado 1 mL de PBS e foi realizada uma fricção contra as paredes dos poços para que houvesse a liberação das células do biofilme. O produto da fricção foi então submetido a uma microdiluição seriada (10^{-8}) e 100uL dos produtos obtidos nos eppendorfs com as diluições 10^{-7} e 10^{-8} foram submetidos ao plantio em Ágar BHI (Titan Biotech LTD., Índia), e incubados por 72 horas a 37°C .

Durante as 72h de incubação, realizou-se a observação da presença de SCVs. Se sugestivo de SCVs, realizou-se o isolamento da colônia para confirmação da espécie através da análise da presença do gene *gyrB*.

Fatores de correção para contagem das SCVs foram aplicados para a diluição encontrada, de acordo com cálculo abaixo.

$$\frac{\text{Contagem de SCVs} \times \text{diluição no qual foi realizada a contagem}}{\text{frequência de geração de SCVs}}$$

5.3 Análise Estatística

Foi utilizado o programa estatístico SigmaXL. Os experimentos foram realizados com pelo menos três réplicas biológicas independentes. O teste não paramétrico de Mann Whitney-Wilcoxon foi utilizado para comparações dos dados das culturas bacterianas. A significância estatística foi determinada em $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Confirmação da identificação da espécie *A. baumannii***

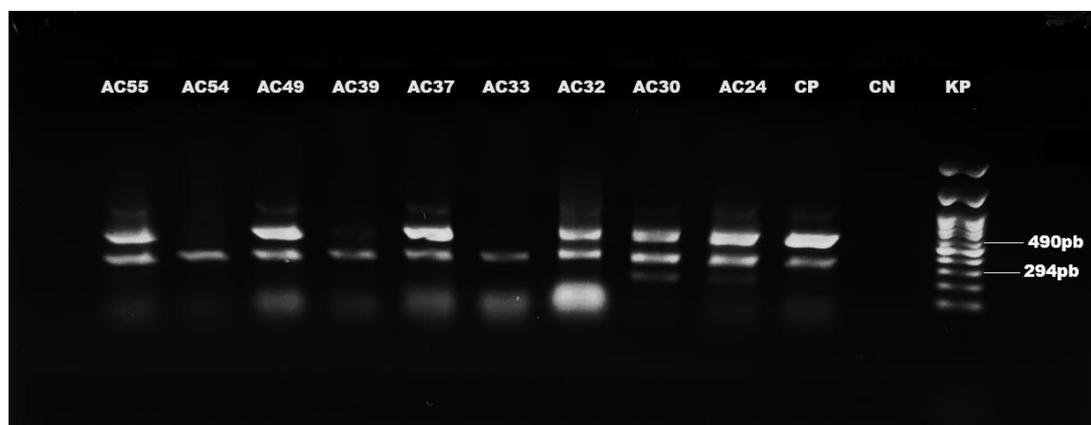
Os isolados bacterianos deste estudo (n=42) foram recuperados de amostras biológicas de pacientes internados, sendo a maioria proveniente de ponta de catéter (12/42) e aspirado traqueal (11/42).

Todos os isolados bacterianos foram submetidos a uma PCR para a detecção de *gyrB* (figura 8) afim de confirmar sua espécie. Apesar de, em estudos realizados anteriormente (FRANÇA *et al* 2015; CASTRO *et al* 2021), todos os isolados terem sido classificados como *A. baumannii*, pudemos observar que alguns destes (12/42; 28,57%) pertenciam na verdade a outras espécies do complexo *ACB*.

O uso de *gyrB* como método para identificar isolados de *Acinetobacter* a nível de espécie não é novo, pois vem sendo utilizado a mais de uma década. Lee e colaboradores (2014) analisaram 495 isolados de *Acinetobacter* afim de diferenciar suas espécies, e para isso utilizou dois métodos de comparação, sendo eles uma PCR multiplex *gyrB* e identificação automatizada pelo Vitek2, obtendo maior precisão para PCR *gyrB* (90,5%) que para o Vitek2. Outro estudo observou um grau de concordância de 100% entre os resultados obtidos de uma PCR *gyrB* quando comparados a Kraken 2 e ANI para identificação de *A. baumannii* (ALBERT, M.J., AL-HASHEM, G., ROTIMI, V.O. 2022).

Por enquanto, o método de PCR *gyrB* é reproduzível e simples de usar, essencial para o estudo epidemiológico de cepas clínicas de *Acinetobacter* (HIGGINGS *et al* 2007).

Figura 8 - Padrão de bandas para *A. baumannii* e espécies do complexo *ACB* em gel de agarose 1,5% .



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Legenda: Padrão de bandas para *A. baumannii* e espécies do complexo *ACB* em gel de agarose 1,5% demonstrando uma banda de 294pb para *A. baumannii* e outras espécies, e uma segunda banda de 490 pb originária apenas de *A. baumannii* obtidas por meio de PCR utilizando primers direcionados ao gene *gyrB* (Higgings, P.G. et al 2007). KP: peso molecular; CN: controle negativo; CP: controle positivo; (AC24, AC39, AC32, AC37, AC49 e AC55): isolados de *A.baumannii*; (AC33, AC39 e AC54): isolados do complexo *ACB*.

Com a análise dos resultados, pode-se observar que 71,42% (n=30) dos isolados foram identificados como *A. baumannii*, como relatado em Tabela 1. Fato importante, uma vez que a diferenciação de espécies do complexo *ACB* pode ser desafiadora, pois são geneticamente relacionadas e fenotipicamente muito difíceis de diferenciar uma das outras (HIGGINGS *et al* 2007).

Tabela 1 - Identificação das espécies - Grupo 1 e 2.

Grupo 1			Grupo 2		
Cepas	Sítios de origem	Espécie	Cepas	Sítios de origem	Espécie
A05	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>	Ac10	Secreção de pele	<i>ACB</i>
B06	Sangue	<i>A. baumannii</i>	Ac12	Secreção de pele	<i>ACB</i>
C08	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>	Ac24	Secreção de pele	<i>A. baumannii</i>
D09	Ponta de catéter	<i>ACB</i>	Ac30	Sangue	<i>A. baumannii</i>
E10	Sangue	<i>A. baumannii</i>	Ac31	Secreção de pele	<i>ACB</i>
F12	Sangue	<i>ACB</i>	Ac32	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>
G16	Aspirado traqueal	<i>ACB</i>	Ac33	Secreção de pele	<i>ACB</i>
H17	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>	Ac35	Secreção traqueal	<i>A. baumannii</i>
I18	Sangue	<i>ACB</i>	Ac37	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>
J19	Sangue	<i>ACB</i>	Ac39	Urina	<i>ACB</i>
K21	Sangue	<i>A. baumannii</i>	Ac40	Secreção traqueal	<i>A. baumannii</i>
L25	Ferida operatória	<i>A. baumannii</i>	Ac45	Secreção traqueal	<i>A. baumannii</i>
M26	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>	Ac46	Urina	<i>A. baumannii</i>
N27	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>	Ac49	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>
P32	Urina	<i>A. baumannii</i>	Ac50	Secreção de pele	<i>A. baumannii</i>
Q33	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>	Ac53	Secreção traqueal	<i>A. baumannii</i>
R34	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>	Ac54	Secreção de pele	<i>ACB</i>
S35	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>	Ac55	Secreção de pele	<i>A. baumannii</i>
T36	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>			
U37	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>			
V38	Ponta de catéter	<i>ACB</i>			
W43	Ponta de catéter	<i>A. baumannii</i>			

Y47	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>
Z48	Aspirado traqueal	<i>A. baumannii</i>

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

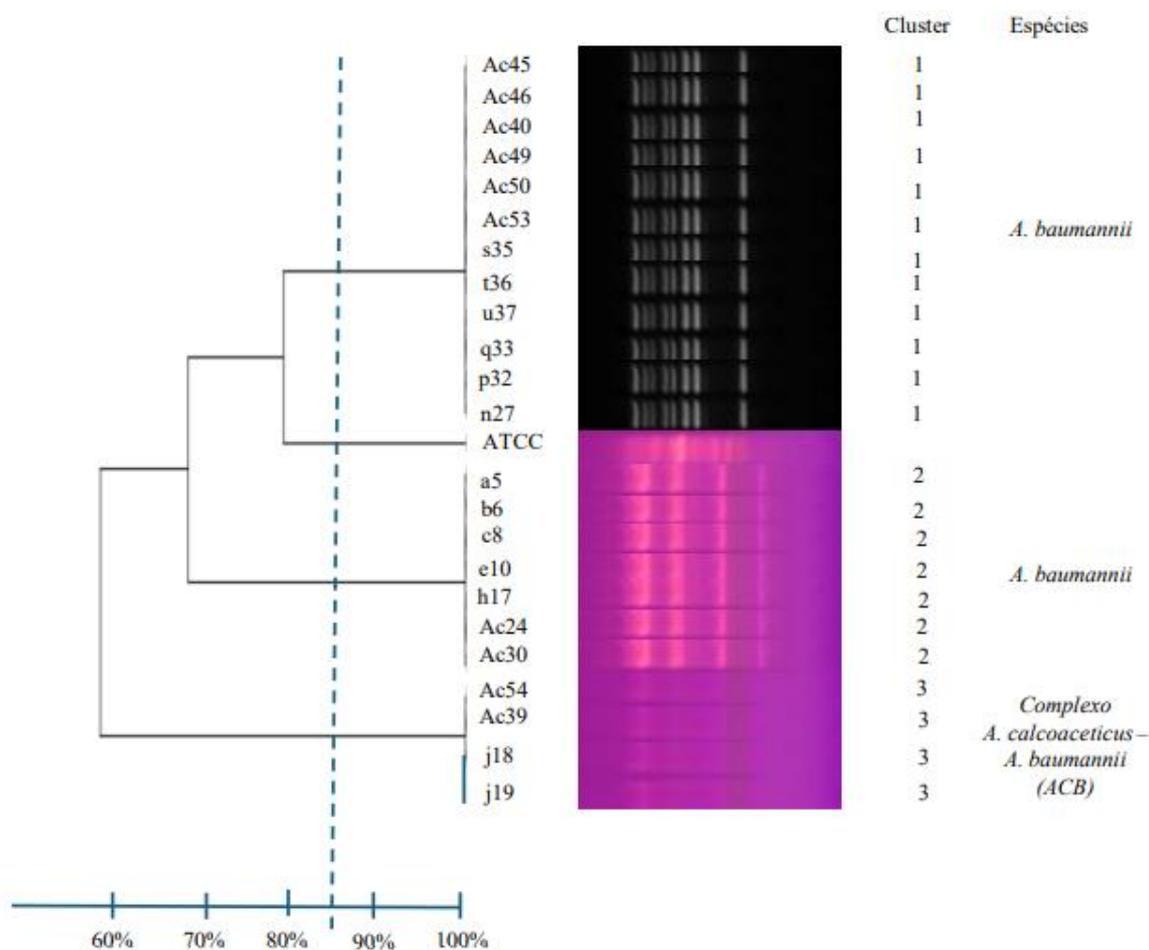
- **Análise da diversidade clonal de todos os isolados**

Clones de bactérias circulantes em hospitais representam um desafio significativo para a saúde pública, pois a disseminação de cepas resistentes pode comprometer a eficácia dos tratamentos e aumentar as taxas de morbidade e mortalidade (MARTÍNEZ & BAQUERO, 2014).

A identificação precisa de cada clone presente em diferentes instituições de saúde é crucial para a implementação de medidas de controle de infecções, além de permitir o rastreamento de surtos e a avaliação da eficácia de intervenções de prevenção. Através de técnicas de Biologia Molecular, como a PCR é possível mapear a diversidade genética dessas bactérias e identificar seus padrões de resistência (AZIZI, O. *et al* 2016). Esse conhecimento não apenas ajuda na personalização dos tratamentos, mas também orienta políticas de saúde pública e estratégias de contenção, promovendo um ambiente hospitalar mais seguro. À medida que novas variantes e mecanismos de resistência surgem, a vigilância contínua e a pesquisa são imperativas para enfrentar essa crescente ameaça.

Durante o desenvolvimento deste trabalho estudamos 42 cepas de *d* sp., mas realizamos o perfil clonal de apenas 23 destas cepas, onde isolamos dois clones de *A. baumannii* que correspondem ao cluster 1 (12 cepas) e 2 (7 cepas) respectivamente (figura 9), formados por cepas sensíveis e resistentes ao antimicrobiano colistina. O clone 3 representado pelo cluster 3 (4 cepas) é formado por cepas do complexo *ACB*. Através de análise da figura 9, pôde-se observar a predominância de dois clones diferentes nos isolados pertencentes ao Grupo 1 advindos do Hospital das Clínicas da UFMG/HC-UFMG e Grupo 2 advindos do Hospital João XXIII em Belo Horizonte-MG.

Figura 9. Padrão de impressão digital de DNA obtido usando DAF4 em gel de agarose 2%.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A identificação dos clones específicos de *A. baumannii* nos permite identificar quais são necessariamente encontrados e se mantêm em circulação em tais hospitais, favorecendo primeiramente o entendimento da dinâmica de infecções dentro de um ambiente de saúde, ajudando a detectar surtos e a prevenir sua disseminação. Em segundo lugar, a identificação precisa das cepas auxilia na escolha dos tratamentos adequados, especialmente em casos de resistência a antimicrobianos. Além disso, essa informação é vital para desenvolver estratégias de controle e prevenção, como a melhoria de protocolos de higiene e a educação de profissionais de saúde.

É importante ressaltar que o pequeno número de clones isolados neste trabalho é consequência do fato de que *A. baumannii* experimentou uma redução do tamanho da população recentemente, com pouco tempo decorrido desde então para que a diversidade se acumulasse novamente (DIANCOURT *et al* 2010). Uma hipótese seria que a redução do tamanho da

população era uma consequência de um nicho ecológico estreito de *A. baumannii*. De fato, esta espécie parece relativamente encontrada causando infecções em humanos e quase nunca encontrada no solo, enquanto que outras espécies de *Acinetobacter* têm uma distribuição mais ampla tanto no solo, quanto como comensais da pele humana (PELEG *et al* 2008). Assim, como o nicho ecológico de *A. baumannii* é mais restrito do que o de outras espécies, seu tamanho populacional pode ter sido contraído por mudanças ecológicas que reduziram seu habitat.

Considerando o que foi dito acima sobre *A. baumannii*, sua significância clínica, especialmente nos últimos 30 anos, foi impulsionada por sua notável capacidade de regular positivamente ou adquirir determinantes de resistência, tornando-o um dos organismos que ameaçam a atual era dos antimicrobianos.

Em referência às cepas pertencentes ao complexo *ACB* (Grupos 1 e 2) elas permaneceram no cluster 3 também formado por cepas sensíveis e resistentes a antimicrobianos.

Tal diversidade clonal encontrada em hospitais pode ser atribuída a diversos fatores, como a alta capacidade de resistência a antimicrobianos, a adaptação a ambientes hospitalares e a facilidade de transmissão entre pacientes e superfícies (MARKOGIANNAKIS, A. *et al* 2008). Esse microrganismo, frequentemente associado a infecções nosocomiais, consegue se estabelecer e proliferar em unidades de terapia intensiva e outros setores críticos devido à pressão seletiva imposta pelo uso inadequado de antimicrobianos e a falta de práticas rigorosas de controle de infecção (PELEG *et al* 2008). Assim, a circulação de um clone específico torna-se uma questão de saúde pública, evidenciando a necessidade de medidas efetivas para prevenir a disseminação e gerenciar a resistência bacteriana dentro das instituições de saúde.

- **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de colistina**

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, neste caso a colistina, foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo e sua classificação seguiu o que propõe o BrCast (2024), como demonstrado em Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de colistina para os isolados de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB* – Grupos 1 e 2.

Grupo 1			Grupo 2		
Cepas	Sítios de origem	ug/mL	Cepas	Sítios de origem	ug/MI
A05	Aspirado traqueal	16R	Ac10	Secreção de pele	4R
B06	Hemocultura	16R	Ac12	Secreção de pele	8R
C08	Aspirado traqueal	8R	Ac24	Secreção de pele	4R
D09	Ponta de catéter	2S	Ac30	Sangue	2S
E10	Hemocultura	16R	Ac31	Secreção de pele	2S
F12	Hemocultura	32R	Ac32	Ponta de catéter	2S
G16	Aspirado traqueal	8R	Ac33	Secreção de pele	4R
H17	Aspirado traqueal	32R	Ac35	Secreção traqueal	4R
I18	Hemocultura	8R	Ac37	Ponta de catéter	16R
J19	Hemocultura	16R	Ac39	Urina	2S
K21	Hemocultura	32R	Ac40	Secreção traqueal	1S
L25	Ferida operatória	2S	Ac45	Secreção traqueal	0,25S
M26	Ponta de catéter	32R	Ac46	Urina	0,5S
N27	Ponta de catéter	4R	Ac49	Ponta de catéter	1S
P32	Urocultura	4R	Ac50	Secreção de pele	1S
Q33	Ponta de catéter	8R	Ac53	Secreção traqueal	1S
R34	Ponta de catéter	2S	Ac54	Secreção de pele	4R
S35	Ponta de catéter	32R	Ac55	Secreção de pele	2S
T36	Aspirado traqueal	32R			
U37	Ponta de catéter	2S			
V38	Ponta de catéter	1S			
W43	Ponta de catéter	4R			
Y47	Aspirado traqueal	4R			
Z48	Aspirado traqueal	32R			

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A. baumannii é conhecida por provocar infecções graves em seres humanos, principalmente aqueles pacientes debilitados e imunossuprimidos que estão internados em UTIs (PEREZ *et al*

2020). Como observado neste estudo, cepas originárias de amostras biológicas como aspirado traqueal, ponta de catéter e hemocultura obtiveram alto nível de resistência (32R), isso muitas das vezes graças a capacidade de *A. baumannii* formar biofilmes em dispositivos médicos. Frente a essa problemática, aliada a altas taxas de mortalidade e resistência ligadas a essa espécie, a OMS elencou *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos como prioridade crítica no desenvolvimento de antimicrobianos, devido ao surgimento de cepas multirresistentes e a falta de medicações para tratamento disponível no mercado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

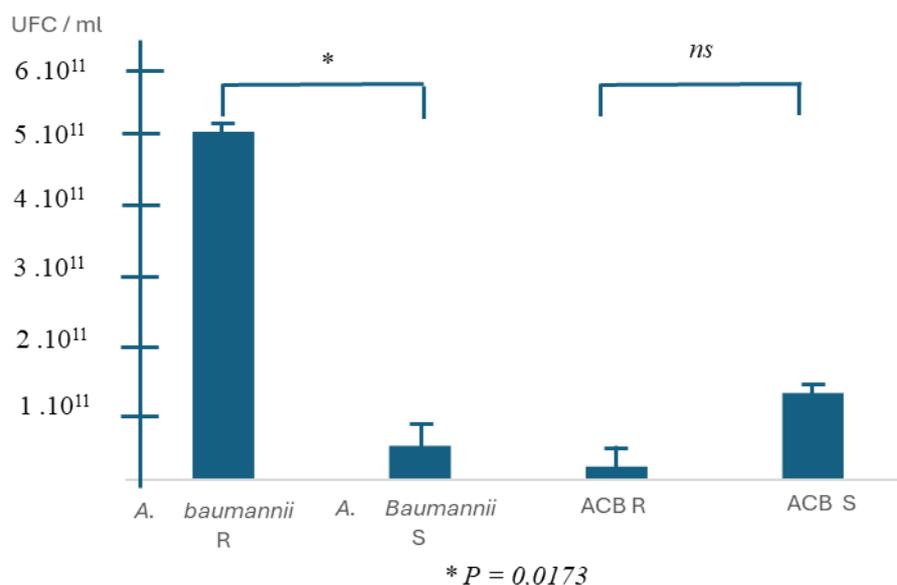
Neste contexto, entram as polimixinas (polimixina B e polimixina E/colistina), última linha de tratamento para infecções por *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos. No entanto, com a alta incidência de infecções por esta bactéria e a ampla utilização desta classe de antimicrobianos, resultou no desenvolvimento de resistência antimicrobiana, tratando-se de um grande problema de saúde pública (EL-MAHDY, 2014).

Neste estudo, a maioria dos isolados bacterianos apresentou resistência a colistina (26/42; 61,90%), sendo que o Grupo 1 apresentou maior porcentagem de isolados resistentes (18/24; 75%) que o Grupo 2 (7/18; 38,9%), onde a faixa de resistência encontrada variou de 4R a 32R. Trata-se de um dado preocupante, uma vez que a resistência a colistina foi recentemente descrita, tendo em vista sua inserção no mercado, e também pelo seu potencial em transferir resistência através de um gene plasmideal (*mcr*), cujo potencial de disseminação é maior e mais rápido (DOI & CARVALHARES, 2017).

- **Quantificação da densidade celular dos biofilmes**

A. baumannii é notoriamente capaz de formar biofilmes, uma característica que contribui significativamente para sua virulência e resistência a tratamentos. A formação de biofilmes permite que *A. baumannii* se fixe em superfícies, como dispositivos médicos e tecidos, criando uma proteção contra agentes antimicrobianos e o sistema imunológico do hospedeiro (GEDEFIE *et al* 2021). Por isso, neste estudo, observamos diferenças significativas na quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB* (gráfico 1).

Gráfico 1 - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB*.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

De acordo com os resultados em Gráfico 1, pôde-se observar que cepas de *A. baumannii* resistentes (R) produzem em média maior densidade celular de biofilmes [$5,02 \times 10^{11}$ UFC/mL] que as cepas sensíveis (S) [$4,9 \times 10^{10}$ UFC/mL] (* $p = 0,0173$). Isso se dá muitas das vezes devido a fatores como estratégia de defesa (MARTINEZ, J. L., BAQUERO, F. 2000), metabolismo adaptativo (FONG, J. N., YILDIZ, F. H. 2015), proteção aumentada (DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. 2002) e interação com outros microrganismos (FLEMMING, H. W., WINGENDER, J. 2010).

Algumas bactérias resistentes são selecionadas em ambientes onde os antimicrobianos estão presentes, levando a um aumento da formação de biofilmes como uma estratégia de defesa, outras podem ter metabólitos ou sistemas de sinalização que favorecem a produção de biofilmes, ajudando na sobrevivência em condições estressantes (metabolismo adaptativo), e outras ainda formam biofilmes em comunidades mistas, onde podem se beneficiar da troca de genes de resistência e de nutrientes (interação com outros microrganismos) (MARTINEZ, J. L., BAQUERO, F. 2000; FONG, J. N., YILDIZ, F. H. 2015; FLEMMING, H. W., WINGENDER, J. 2010). Por fim, biofilmes proporcionam uma barreira física que impede a penetração de antimicrobianos e a ação do sistema imunológico, permitindo que as bactérias resistentes se estabeleçam e proliferem mais efetivamente (proteção aumentada) (DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. 2002).

Em referência ao complexo *ACB*, não encontramos resultados significativos entre cepas *ACB* sensíveis (S) [$1,25 \times 10^{11}$ UFC/mL] e *ACB* resistentes (R) [$1,92 \times 10^{10}$ UFC/mL] (ns) no que diz respeito à densidade celular do biofilme.

Vários são os fatores que podem estimular a formação de biofilmes em bactérias, em especial, *A. baumannii*, como a aderência a superfícies sólidas (COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., & GREENBERG, E. P., 1999), maior oferta de nutrientes (GHAFAR, A., & GHOSH, A., 2016), alto teor de umidade (FLEMMING, H.-W., & WUERTZ, S. 2019), interações inespecíficas com outras bactérias (KOLENBRANDER, P. E. *et al* 2002), alterações nas condições físico-químicas como pH, temperatura e concentrações de sal (O'TOOLE, G. A., & KOLTER, R., 1998). Outros fatores, como sinalização Quórum sensing (Waters, C. M., & BASSLER, B. L. 2005), que muitas bactérias utilizam para coordenar a formação de biofilmes, detectando a densidade populacional, e o estresse ambiental (FAGERLUND, A. *et al* 2016) quando na presença de antimicrobianos, também são fatores que induzem uma maior formação de biofilmes em bactérias.

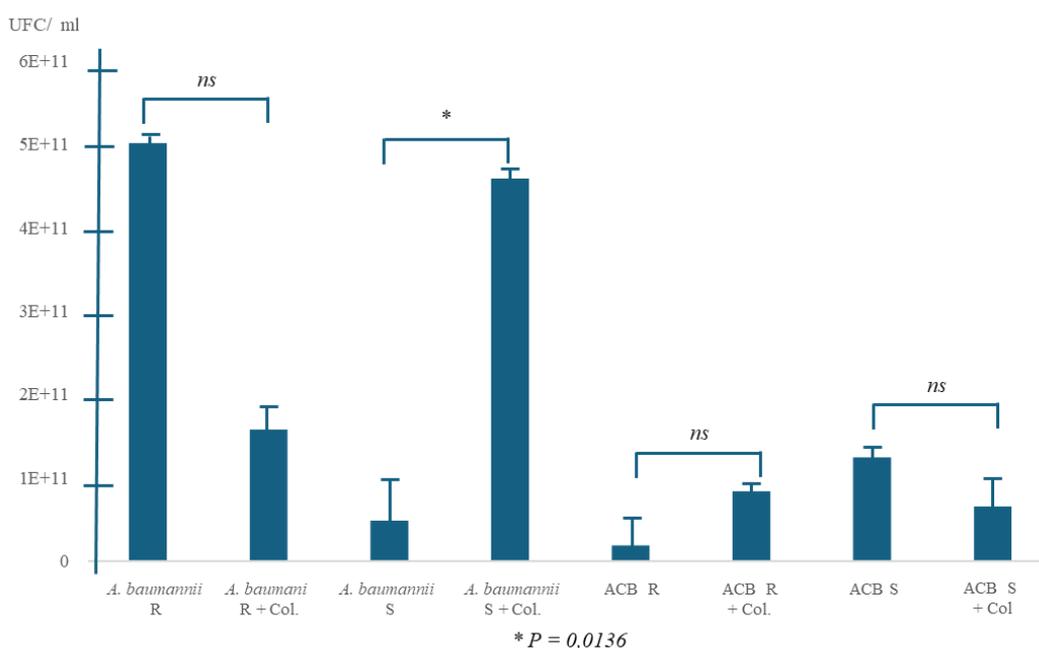
Alguns autores sugerem ainda que esse estresse ambiental se dá sob pressão de concentrações subinibitórias de antimicrobianos. Kaplan (2011), Sato e colaboradores (2018) e Wang e colaboradores (2010) demonstraram em seus estudos que concentrações subinibitórias de várias classes de antimicrobianos podem induzir a formação de biofilme em diversas bactérias. Inclusive, estudos anteriores também determinaram que a formação de biofilme robusto em *A. baumannii* está correlacionada com a resistência a 5 antimicrobianos comumente utilizados em hospitais (tetraciclina, sulfametoxazol-trietoprim, gentamicina, ceftazidima e ticarcilina) (YANG C. H. *et al* 2019). Em 2024, Bhavya e colaboradores demonstraram que a exposição a concentrações sub-MIC de colistina e imipenem alterou a expressão de genes relacionados à formação de biofilmes, resultando no surgimento de células resistentes a antimicrobianos, e tais concentrações sub-inibitórias podem favorecer o crescimento e a resiliência de biofilmes, contribuindo para a disseminação de células e a rápida aquisição de resistência em comunidades microbianas hospitalares. Outros ainda sugerem que biofilmes tratados com antimicrobianos apresentaram características mais virulentas em comparação aos biofilmes convencionais (YAMABE, K. *et al* 2022).

Em *A. baumannii* Lin e colaboradores (2020) demonstraram que a adição de uma concentração subinibitória de tigeciclina aumentou sua capacidade de formação de biofilme, e

que essa capacidade varia entre diferentes linhagens da bactéria envolvendo diversos genes, além de ser influenciada por vários compostos químicos.

Por isso, neste estudo, utilizamos uma concentração subinibitória do antimicrobiano colistina para estimular as colônias de *Acinetobacter* a produzirem maior ou menor densidade celular de biofilme. Os resultados obtidos encontram-se em Gráfico 2.

Gráfico 2 - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão de concentração subinibitória de colistina.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A colistina é um antimicrobiano da classe das Polimixinas, especialmente eficaz contra bactérias gram-negativas. Retornou ao mercado nos últimos anos devido múltiplos casos de multirresistência aos antimicrobianos, fazendo com que o leque de tratamento para infecções MDR se tornasse cada vez mais escasso (LEE, G.C.; BURGESS, D.S. 2012). Utilizada principalmente em infecções graves e em ambientes hospitalares, a colistina se destaca por sua capacidade de atuar na membrana celular das bactérias, levando à sua destruição (BISWAS, S. *et al* 2012). Contudo, seu uso deve ser cauteloso devido à possibilidade de toxicidade renal e ao desenvolvimento de resistência microbiana, o que a torna uma opção frequentemente reservada para última linha de tratamento (NI, W. *et al* 2019). Nos últimos anos, a colistina voltou a ganhar

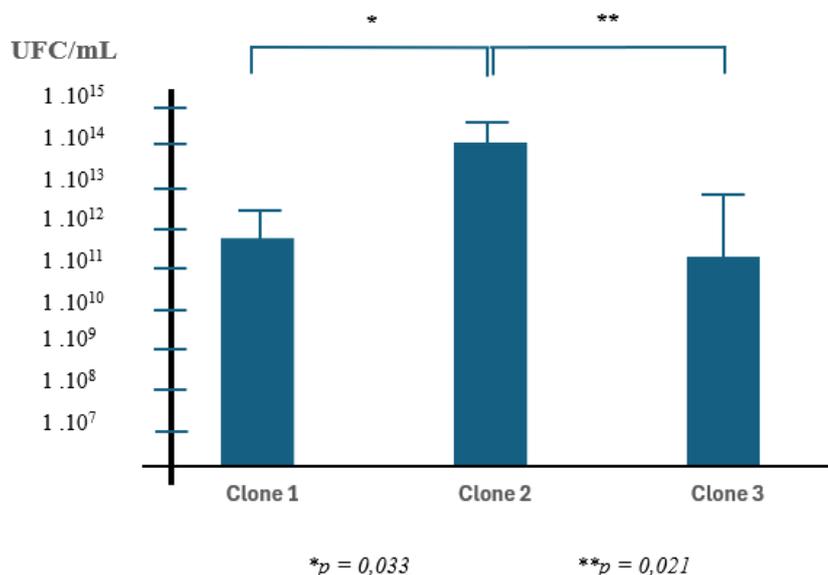
atenção em função do aumento da resistência a antimicrobianos, ressaltando a importância de monitorar sua utilização e eficácia.

Nesse sentido, no Gráfico 2 pôde-se observar que colônias de *A. baumannii* resistentes (R) não tratadas com colistina produzem maior densidade celular de biofilme [$5,02 \times 10^{11}$ UFC/mL] do que cepas de *A. baumannii* resistentes (R) tratadas com colistina [$1,58 \times 10^{11}$ UFC/mL], no entanto essa diferença não é significativa (ns). Ao considerar cepas de *A. baumannii* sensíveis (S) ao antimicrobiano colistina, quando expostas a concentrações subinibitórias do mesmo produzem maior densidade de biofilme [$4,6 \times 10^{11}$ UFC/mL] do que cepas de *A. baumannii* sensíveis (S) não expostas a concentrações subinibitórias de colistina [$4,9 \times 10^{10}$ UFC/mL] e essa diferença é significativa (* $p = 0,0136$). Dados como esse confirmam o que Kaplan (2011), Sato e colaboradores (2018) e Wang e colaboradores (2010) relataram em seus estudos já citados anteriormente. Outros autores, como Bhavya et al (2024) também revelaram que a exposição a concentrações subinibitórias de colistina afetou os padrões de expressão de genes associados a biofilme e a formação de biofilme. Dados como esse são de grande preocupação em saúde pública, uma vez que os biofilmes são frequentemente responsáveis por infecções persistentes em ambientes clínicos, como em dispositivos médicos e cateteres, contribuindo para complicações em pacientes e prolongando o tempo de internação (DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. 2002). O entendimento e manejo eficaz de infecções por biofilmes são, portanto, essenciais para melhorar os resultados clínicos e reduzir a carga econômica sobre os sistemas de saúde.

Em referência ao complexo *ACB*, não encontramos resultados significativos em relação à densidade celular dos biofilmes entre cepas *ACB* sensíveis (S) não tratadas com colistina [$1,25 \times 10^{11}$ UFC/mL] e cepas *ACB* sensíveis (S) tratadas com concentrações subinibitórias de colistina [$6,6 \times 10^{10}$ UFC/mL] (ns) Gráfico 2. Além disso não encontramos resultados significativos em relação à densidade celular dos biofilmes entre cepas *ACB* resistentes (R) não tratadas com colistina [$1,9 \times 10^{10}$ UFC/mL] e cepas *ACB* resistentes (R) tratadas com concentrações subinibitórias de colistina [$8,4 \times 10^{10}$ UFC/mL] (ns) Gráfico 2.

Por fim, foi analisada a formação de biofilmes pelos diferentes clones de *Acinetobacter*. No entanto, foram encontrados resultados significativos apenas para os isolados sob pressão antimicrobiana de colistina. Os resultados encontram-se em Gráfico 3, sendo o clone 2 associado a maior produção de densidade celular de biofilmes, seguido pelos clones 1 e 3, respectivamente.

Gráfico 3 - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão de concentração subinibitória de colistina nos diferentes clones de *Acinetobacter*.



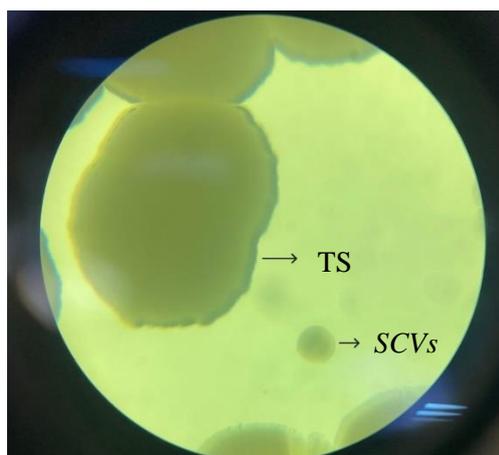
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

De certa forma, qualquer clone de *A. baumannii* é motivo de preocupação devido à sua resistência a múltiplos antimicrobianos e ao potencial de causar infecções hospitalares graves. Neste estudo, identificamos três clones circulantes nos hospitais HC/UFGM e João XXIII, mas o clone 2 se destaca por estar associado a uma maior formação de densidade celular de biofilmes (gráfico 3), onde pôde-se observar que o clone 2 produz em média maior densidade celular de biofilme sob pressão de concentração subinibitória de colistina [$1,29 \times 10^{14}$ UFC/mL] que os clones 1 e 3 [$5,22 \times 10^{11}$ UFC/mL] [$1,79 \times 10^{11}$ UFC/mL] respectivamente, e essas diferenças são significativas ($p = 0,033$) e ($p = 0,021$). Tal característica é alarmante, pois os biofilmes tornam as bactérias mais resistentes a tratamentos antimicrobianos e dificultam sua erradicação, aumentando o risco de infecções persistentes e complicações para os pacientes. A presença desse clone mais virulento eleva a preocupação da população e serviços de saúde, que podem enfrentar um maior risco de infecções severas e prolongadas.

- **Análise da formação de SCVs com e sem pressão antimicrobiana de colistina nos diferentes clones de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB***

Em associação a análise da quantificação da densidade celular dos biofilmes, foi possível analisar a frequência de formação de *SCVs* pelas colônias de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB*. Essas *SCVs*, conhecidas como variantes de pequenas colônias, são subpopulações bacterianas, que crescem de forma instável, lenta e com tamanho reduzido, sendo aproximadamente 10 vezes menor do que o tamanho ideal das colônias bacterianas Tipo Selvagem (TS) (KAHL *et al* 1998). Essas colônias apresentam um metabolismo deficiente, diferenciando-se das cepas TS, devido aos processos bioquímicos defasados, como na respiração e obtenção de energia (TRABER *et al* 2008).

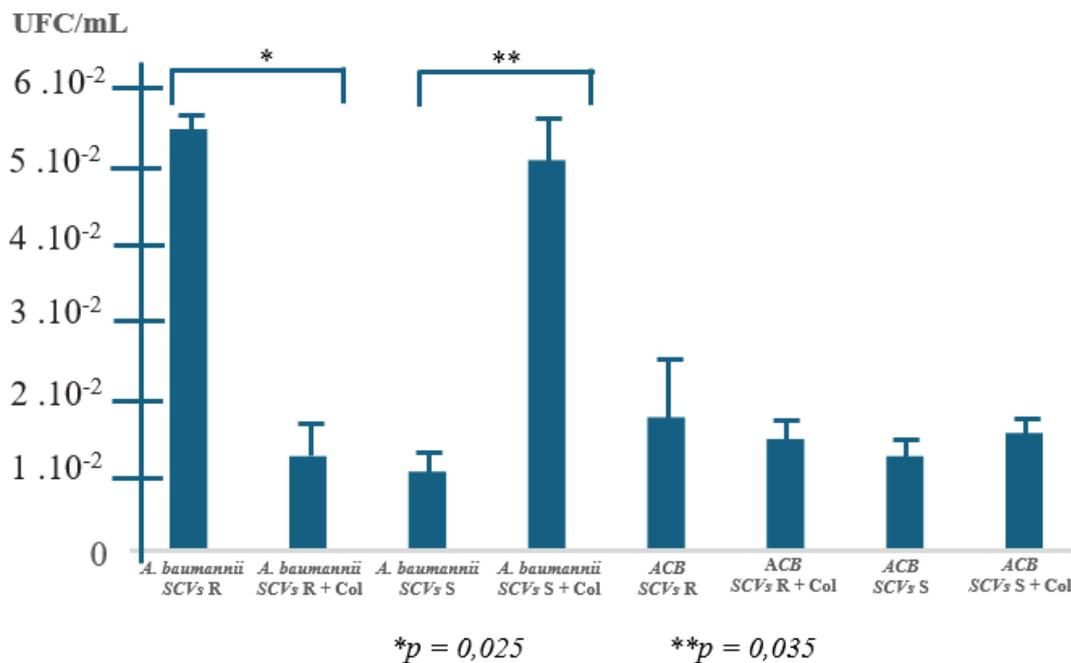
Figura 10. Comparação de tamanho entre colônia normal de *A. baumannii* e *SCVs* através de microscopia.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Neste estudo, a maioria dos isolados foram produtores de *SCVs* seja por pressão antimicrobiana de colistina ou por incubação >48h. Os resultados encontram-se no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Análise da frequência de formação de *SCVs* de *A. baumannii* e complexo *ACB* sob pressão ou não de concentração subinibitória de colistina.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

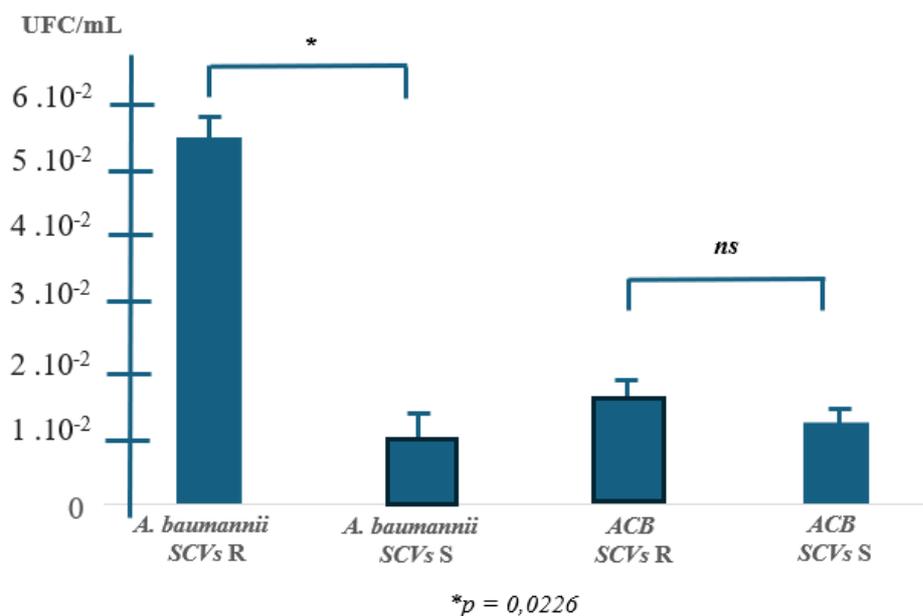
Em referência ao Gráfico 4 pôde-se observar que colônias de *A. baumannii* resistentes (R) a colistina têm uma maior frequência de formação de *SCVs* [$5,4 \times 10^{-2}$] quando não submetidas a concentrações subinibitórias de colistina que quando são expostas a colistina [$1,2 \times 10^{-2}$] e essa diferença é significativa ($*p = 0,025$). É interessante notar em Gráfico 4 que as colônias de *A. baumannii* sensíveis (S) à colistina têm uma maior frequência de formação de *SCVs* quando são expostas a concentrações subinibitórias do mesmo antimicrobiano [5×10^{-2}] do que quando não são expostas [1×10^{-2}] e estas diferenças são significativas ($p = 0,035$). Dados como esse confirmam o que autores como, Jacobs e colaboradores (2013) e Melter e Radojevi (2010) sugerem em seus estudos, onde uma pressão com concentrações subinibitórias de antimicrobianos induzem maior formação de *SCVs*. Outros autores sugerem que concentrações subinibitórias de antimicrobianos aumentam a frequência de geração de *SCVs*, porque concentrações subinibitórias dos mesmos estimulam as taxas de mutação em bactérias através da resposta SOS que permite a geração de *SCVs* (VESTERGAARD *et al* 2015). E não só apenas a exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos que desencadeiam a ativação da resposta SOS e um aumento temporário na taxa de mutação, mas as condições após o contato com o sistema imunológico também podem ativar essa resposta SOS (IMLAY *et al* 1987).

Portanto, a inibição química que previne a ativação da resposta SOS poderia ser potencialmente usada como adjuvante para reduzir o surgimento e estabelecimento de *SCVs* durante uma infecção, uma estratégia que também foi proposta para desacelerar a evolução da resistência antimicrobiana em direção a várias classes de antimicrobianos (CIRZ *et al* 2005).

Ainda com a análise do Gráfico 4, não encontramos diferenças significativas se considerarmos a frequência de geração de *SCVs* nas cepas do complexo *ACB* resistentes (R) a colistina tratados com concentrações subinibitórias do mesmo [9×10^8 UFC/mL] em comparação com cepas não tratadas com colistina [$1,6 \times 10^{11}$ UFC/mL] (ns). Também não encontramos diferenças na frequência de geração de *SCVs* por cepas do complexo *ACB* sensíveis (S) a colistina tratados com concentrações subinibitórias do mesmo [1×10^{10} UFC/mL] em comparação com cepas não tratadas com colistina [$8,65 \times 10^{11}$ UFC/mL] (ns). Provavelmente, tanto as cepas resistentes e sensíveis pertencentes ao complexo *ACB* não são boas formadoras de *SCVs*.

Neste estudo observamos também a diferença na frequência de formação de *SCVs* em colônias de *Acinetobacter* resistentes (R) e sensíveis (S) a colistina em Gráfico 5.

Gráfico 5 - Análise da frequência de formação de *SCVs* de *A. baumannii* e complexo *ACB* sensíveis (S) e resistentes (R) a colistina.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Com isso, em Gráfico 5, pôde-se observar que colônias de *A. baumannii* resistentes (R) a colistina produzem uma maior frequência de geração de *SCVs* [$5,4 \times 10^{-2}$] quando comparados aos isolados sensíveis (S) [1×10^{-2}] ($p = 0,0226$). Isso se dá porque como são colônias já resistentes a colistina, essa exposição a mesma passa a induzir outros mecanismos de resistência, como a formação das *SCVs*, justamente por estar sendo exposta a uma concentração que não é clinicamente eficaz para sua destruição. Isso se dá muitas das vezes devido ao uso irracional destes medicamentos, tratando-se de um dado muito importante, pois reflete a realidade social que vivemos hoje, especialmente quando falamos em antimicrobianos.

A resistência aos antimicrobianos é hoje um problema global crescente que tem sido associado ao uso irracional desses medicamentos. Progressivamente, o uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, e até mesmo multirresistentes, tornando o tratamento dessas infecções cada vez mais desafiador. Essa resistência não apenas compromete a eficácia de tratamentos disponíveis, mas também aumenta os custos de saúde e os riscos para a segurança dos pacientes (MELO, PAUFERRO 2020).

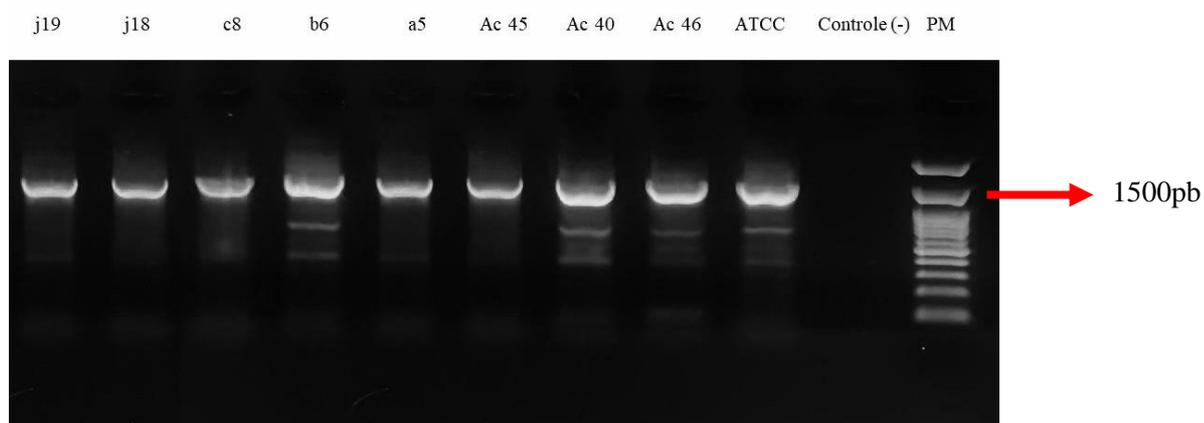
No Brasil, o uso inadequado de medicamentos muitas vezes está ligado à falta de organização na assistência médica. Isso pode levar a situações como a polifarmácia, a prescrição indiscriminada e inadequada de antimicrobianos (OMS, 2010), a falta de orientação por diretrizes, a automedicação inapropriada e a disponibilidade excessiva de opções terapêuticas no mercado. Esses fatores contribuem para um uso excessivo, ou inadequado de medicamentos, resultando em prejuízos para a população e em desperdício de recursos públicos (PORTELA, 2020). Enquanto isso nos Estados Unidos, Fiol e colaboradores (2010) relataram que os custos associados à resistência bacteriana chegam a 4 a 5 bilhões de dólares por ano, já no Brasil esse valor ultrapassa a marca de 1 bilhão de reais. Dados como esses evidenciam a magnitude do impacto financeiro e de saúde causado pela resistência bacteriana e ressaltam a necessidade urgente de abordagens eficazes para enfrentar esse problema crescente. Ainda considerando o gráfico 5, não encontramos resultados significativos no que se refere à frequência de formação de *SCVs* por cepas do complexo *ACB* resistentes [$1,6 \times 10^{11}$ UFC/mL] e sensíveis [$8,65 \times 10^{11}$ UFC/mL] (ns), cepas pertencentes ao clone 3 provavelmente produzem poucas *SCVs* durante a formação do biofilme.

- **Análise da presença do gene *bap*, associado a formação de biofilmes nos diferentes isolados de *A. baumannii* e outras espécies do complexo *ACB***

O gene *bap*, importante fator de virulência em cepas de *A. baumannii*, desempenha um papel crucial na formação de biofilmes (AZIZI, O. *et al* 2016). A expressão do *bap* está associada à capacidade da bactéria de se colonizar em ambientes hospitalares, contribuindo para a persistência e resistência a tratamentos antimicrobianos. Além disso, a presença desse gene está relacionada a infecções nosocomiais, uma vez que os biofilmes facilitam a resistência do patógeno a mecanismos do sistema imunológico e a desinfetantes, tornando o combate a infecções mais desafiador (BROSSARD & CAMPAGNARI, 2012). A compreensão do papel do gene *bap* é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e prevenção de infecções por *A. baumannii*.

Tendo em vista tal problemática, neste estudo analisamos a presença do gene *bap* em isolados de *A. baumannii* e complexo *ACB* (figura 11).

Figura 11. Análise da presença do gene *bap* nos isolados de *A. baumannii* e complexo *ACB*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Legenda: Padrão de bandas para gene *bap* de *A. baumannii* e espécies do complexo *ACB* em gel de agarose 1%, demonstrando uma banda de 1500pb que representa a presença do gene *bap*, obtidas por meio de PCR utilizando primers F e R. PM: peso molecular; isolados clínicos (Ac46, Ac40, Ac45, a5, b6, c8, j18, j19).

De fato, os isolados resistentes e sensíveis de *A. baumannii* analisados neste estudo apresentaram a presença do gene *bap*, o que enfatiza a relevância desse gene na virulência e na

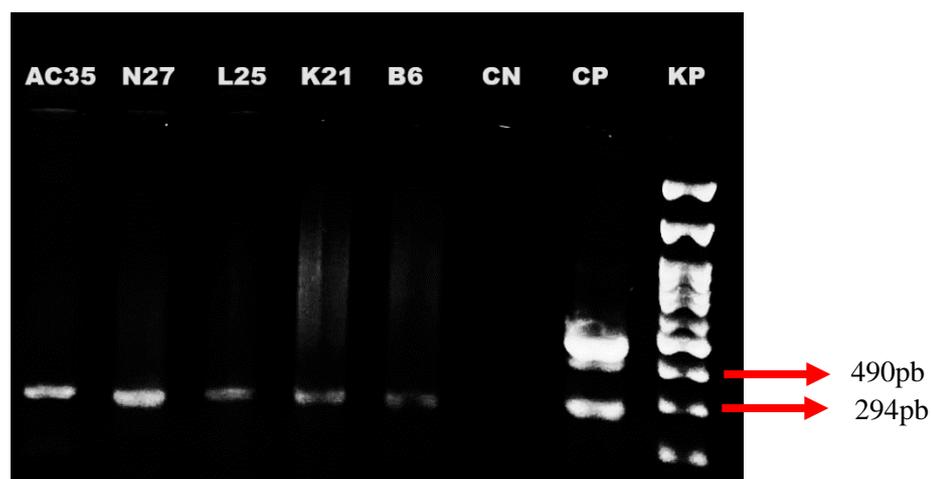
capacidade de formação de biofilmes das cepas circulantes em ambientes hospitalares. A detecção do gene *bap* sugere que esses isolados podem ter um potencial aumentado de adesão e colonização, contribuindo para a persistência das infecções nosocomiais e dificultando a eliminação do patógeno por métodos convencionais de desinfecção e tratamento. Essa característica reforça a necessidade de monitoramento e estratégias eficazes de controle de infecção, uma vez que a presença do gene pode estar associada a uma maior resistência a antimicrobianos e a um aumento da gravidade das infecções causadas por *A. baumannii*.

Loehfelm e colaboradores (2008) notaram um aumento significativo na expressão do gene *bap* no biofilme de duas cepas clínicas de *A. baumannii* isoladas em um hospital de Porto Alegre. Enquanto isso, outros estudos demonstram ainda que 66,2% dos isolados de *A. baumannii* continham o gene *bap* e foram capazes de formar biofilmes bem robustos (BADMASTI *et al* 2015). De forma geral, assim como evidenciado neste trabalho, estudos têm mostrado que a expressão deste gene favorece a adesão das células à superfície, facilitando a formação de comunidades microbianas estruturadas e protegidas (BROSSARD & CAMPAGNARI, 2012). Dessa forma, torna-se essencial a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à formação de biofilmes mediada pelo gene *bap*, por ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e para o manejo de infecções causadas por este microrganismo resistente.

- **Confirmação da espécie das SCVs por meio da presença do gene *gyrB* pela técnica de PCR**

Por fim, para que não houvessem dúvidas quanto a procedência das SCVs, foi realizada uma PCR *gyrB* de todas SCVs de *Acinetobacter* encontradas neste estudo afim de confirmar a espécie e descartar qualquer tipo de contaminação microbiana. Encontramos alguns resultados interessantes que se encontram em Figura 12.

Figura 12 - Padrão de bandas para *SCVs* de *A. baumannii* e espécies do complexo *ACB* em gel de agarose 1,5%.



Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Legenda: Padrão de bandas para *SCVs* de *A. baumannii* e espécies do complexo *ACB* em gel de agarose 1,5% demonstrando uma banda de 294pb para *A. baumannii* e outras espécies, e uma segunda banda de 490 pb originária apenas de *A. baumannii* obtidas por meio de PCR utilizando primers direcionados ao gene *gyrB* (Higgings, P.G. et al 2007). KP: peso molecular; CN: controle negativo; CP: controle positivo; isolados clínicos (B6, K21, L25, N27, AC35).

Na Figura 12 podemos observar que, colônias normais de isolados antes identificados como *A. baumannii*, agora emitiram um padrão de bandas diferente para *SCVs*. Trata-se de um fato curioso, uma vez que nos surgem algumas perguntas frente aos resultados obtidos, como: “*SCVs* de *A. baumannii* apresentam uma inserção ou deleção no gene *gyrB*?” ou ainda “Há além de mudanças fenotípicas, mudanças também genéticas em *SCVs* que ainda não foram bem descritas?”. São perguntas que talvez possam ser respondidas pela realização de um sequenciamento parcial de 16S rRNA desses isolados, o que traria além de respostas, mais informações científicas sobre essa subpopulação bacteriana, onde os dados da literatura são ainda muito escassos.

7. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que cepas resistentes de *A. baumannii* produzem maior densidade celular de biofilme que cepas sensíveis, assim como maior geração de *SCVs*, que são reconhecidas por sua resistência aumentada e capacidade de persistência em ambientes hostis.

Inclusive, concentrações subinibitórias do antimicrobiano colistina não apenas favorecem a formação de biofilmes em cepas sensíveis de *A. baumannii*, mas também estimulam o surgimento de SCVs. Além disso, identificamos a presença do gene *bap* nas cepas de *A. baumannii* analisadas, que está diretamente relacionado a uma maior formação de biofilmes, reforçando a importância desse gene na patogenicidade das infecções. Além disso, a disseminação global dos clones mundiais (GC1 – GC9) de *A. baumannii*, como os 3 identificados neste trabalho, acentua essa problemática, uma vez que o clone 2 demonstrou maior capacidade de formação de biofilme quando sob pressão antimicrobiana de colistina, evidenciando a necessidade urgente de estratégias eficazes de controle e prevenção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, Iain; *et.al.* **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 11, n. 4, p. 395-409, jan. 2013. DOI: [://doi.org/10.1586/eri.13.21](https://doi.org/10.1586/eri.13.21). Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.13.21?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 14 mar. 2024.
2. ABDI, Seyyed N.; *et.al.* ***Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance.** *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 423-434, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147%2FIDR.S228089>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7024869/>. Acesso em: 02 abr. 2024.
3. AEDH, Abdullah I.; *et.al.* **Occurrence of Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter spp.*: An Emerging Threat for Nosocomial-Borne Infection in Najran Region, KSA.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 2, p. 108, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020108>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36828524/>. Acesso em: 23 mar. 2024.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Módulo 10: Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica.** 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt->

- [br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf](http://centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf). Acesso em: 15 fev. 2024.
5. AHMAD, Irfan; *et.al.* **Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.** PLOS One, v. 14, n. 1, e0210082, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210082>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30608966/>. Acesso em: 22 mar. 2024.
 6. Albert, M.J.; Al-Hashem, G.; Rotimi, V.O. **Multiplex *gyrB* PCR Assay for Identification of *Acinetobacter baumannii* Is Validated by Whole Genome Sequence-Based Assays.** *Med Princ Pract.* 2022;31(5):493-496. DOI: [10.1159/000526402](https://doi.org/10.1159/000526402)
 7. ALIRAMENZANI, Amir; *et.al.* **Clonal relatedness and biofilm formation of OXA-23-producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment.** *Microbial Pathogenesis*, v. 99, p. 204-208, out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401016303722>. Acesso em: 09 mai. 2024.
 8. ALÓS, Juan-Ignacio.; *et.al.* **Quinolonas Quinolones.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, n. 5, p. 290-297, mai. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X09002468?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2024.
 9. ALVES, Rebecca L. **Caracterização Molecular de Isolados Pertencentes ao Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Obtidos de Amostras Clínicas e Ambientais.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/server/api/core/bitstreams/aa5e8227-81c6-4134-8b10-d554b98fc38e/content>.
 10. ANTUNES, Jessica B. **Estudo da contribuição de bombas de efluxo, porinas e β -lactamases na resistência de carbapenemos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.** 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 2018. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/114950/1/Tese_Jessica_versao7Jun18_versaofinalfinal_CD.pdf.

11. ANTUNES, Luísa C.S; VISCA, Paolo; TOWNER, Kevin J. **Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen.** *Pathogens and Disease*, v. 71, n. 3, p. 292-301, ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/71/3/292/475786?login=false>. Acesso em: 26 jan. 2024.
12. ANTUNES, Nuno T.; FISHER, Jed F. **Acquired Class D β -Lactamases.** *Antibiotics (Basel)*, v. 3, n. 3, p. 398-434, set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fantibiotics3030398>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4790369/>. Acesso em: 03 abr. 2024.
13. ASHIDA, Hiroshi; *et al.* **Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival.** *Journal of Cell Biology*, v. 195, n. 6, pg. 931-942, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201108081>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22123830/>. Acesso em: 11 jun. 2024.
14. ASOKAN, Govindaraj V.; *et.al.* **WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain.** *Oman Medical Journal*, v. 34, n. 3, p. 184-193, set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110624/>. Acesso em: 03 mai. 2024.
15. ATALLA, Heba; *et.al.* **Characterization of a *Staphylococcus aureus* Small Colony Variant (SCV) Associated with Persistent Bovine Mastitis.** *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 5, n. 6, p. 785-799, dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0110>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2008.0110>. Acesso em: 09 jun. 2024.
16. AZIZI, Omid; *et al.* **Molecular Analysis and Expression of *bap* Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 5, n. 1, pg. 62-72, out. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214686/>. Acesso em: 24 mai. 2024.
17. BADMASTI, Farzad *et al.* **Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, n. 5, p. 559-564, 1 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000058>. Acesso em: 29 out. 2024.
18. BARBOSA, Maralisi Coutinho. **Determinação da suscetibilidade à vancomicina e avaliação de atributos de virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de**

- bacteremias**. 2018. 131 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018. Acesso em: 22 ago. 2024.
19. BAROUD, M., *et al.* **Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 41, n. 1, pg. 75-79, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.010>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23142087/>. Acesso em: 15 abr. 2024.
20. BATISTA, Marina J. *et al.* **Concentração de DNA e DMSO em Protocolo RAPD-PCR para Estudo de Diversidade Genética de *Fimbristylis Miliacea*.** 2020. Graduação em Ciências Biológicas – Universidade do Vale do Itajaí, 2020. Disponível em: https://www.sosbai.com.br/uploads/trabalhos/concentracao-de-dna-e-dms0-em-protocolo-rapd-pcr-para-estudo-de-diversidade-genetica-de-fimbristylis-miliacea_959.pdf.
21. BENTANCOR, Leticia V.; *et al.* **Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 15, pg. 3950-3960, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.06769-11>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22609912/>. Acesso em: 09 abr. 2024.
22. BEVERIDGE, Terry J.; *et al.* **Interactions between biofilms and the environment.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3-4, pg. 291-303, jul. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/20/3-4/291/516106?login=false>. Acesso em: 08 fev. 2024.
23. BHAVYA, J.N.; ANUGNA, S.S.; PREMANATH, Ramya. **Sub-inhibitory concentrations of colistin and imipenem impact the expression of biofilm-associated genes in *Acinetobacter baumannii*.** *Arch Microbiol.*, 206:169, p. 1-14, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03869-w>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38489041/>. Acesso em: 20 ago. 2024.
24. BIERHALS, Christine G.; *et al.* **Avaliação da expressão relativa dos genes envolvidos na formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii*.** *Revista Brasileira de Biociências*, v. 16, n. 3, p. 87-97, set. 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/187745/001084146.pdf?sequence=1>. Acesso em: 07 jun. 2024.

25. BONIN, Renata F. **Identificação de Proteínas Imunogênicas para o Desenvolvimento De Estratégias Baseadas em Imunoterapia Contra Infecções por *Acinetobacter spp.*** 2011. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/6011/renata-bonin.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
26. BREIJ, Anna de; *et al.* **CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606^T to human airway epithelial cells and their inflammatory response.** *Research in Microbiology*, v. 160, n. 3, pg. 213-218, abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.01.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250809000035>. Acesso em: 17 jan. 2024.
27. BROSSARD, Karl A.; CAMPAGNARI, Anthony A. **The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells.** *Infection and Immunity*, v. 80, n. 1, p. 228-233, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.05913-11>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.05913-11>. Acesso em: 28 mar. 2024.
28. CABRAL, Maria P.; *et al.* **Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism.** *Journal of Proteome Research*, v. 10, n. 8, pg. 3399-3417, mai. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr101299j>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21612302/>. Acesso em: 22 mai. 2024.
29. CAMARENA, Laura.; *et.al.* **Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing.** *PLOS Pathogens*, v. 6, n. 4, e1000834, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000834>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368969/>. Acesso em: 24 fev. 2024.
30. CAMPOS Manuel; *et al.* **The type II secretion system – a dynamic fiber assembly nanomachine.** *Research in Microbiology*, v. 164, n. 6, pg. 545-555, ago. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250813000569>. Acesso em: 18 mai. 2024.
31. CANGUSSU, Edson W.S. **Importância do *Acinetobacter baumannii* no ambiente hospitalar.** *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 041-046, mai. 2020.

- DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v8n1.cangussu>. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/7724>. Acesso em: 3 mar, 2024.
32. CARVALHO, Karyne R.; *et.al.* **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 34, n. 1, p. 25-28, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19216059/>. Acesso em: 09 mai. 2024.
33. CASTANHEIRA, Mariana; MENDES, Rodrigo E.; GALES, Ana C. **Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 76, n. 2, p. S166-S178, mai. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad109>. Disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/76/Supplement_2/S166/7140355?login=false. Acesso em: 27 mar. 2024.
34. CASTILLO-RAMÍREZ, Santiago. **Genomic epidemiology of *Acinetobacter baumannii* goes global.** *mBio*, v. 14, n. 6, e02520-23, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1128%2Fmbio.02520-23>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10746248/>. Acesso em: 05 mar. 2024.
35. CATEL-FERREIRA, Manuella; *et al.* **Structure–function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 9, pg. 2053-2056, set. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr267>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/66/9/2053/770765>. Acesso em: 18 abr. 2024.
36. CHAN, Kwan-Wai; *et.al.* **Specific Amino Acid Substitutions in OXA-51-Type β -Lactamase Enhance Catalytic Activity to a Level Comparable to Carbapenemase OXA-23 and OXA-24/40.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 9, p. 4496, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094496>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35562886> Acesso em: 23 jan. 2024.
37. CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ, Itziar; *et al.* ***Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation.** *PLOS ONE*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0201961>. Acesso em: 15 fev. 2024.

38. CHEN, Chyi-Liang; *et al.* **d-mannose-sensitive pilus of *Acinetobacter baumannii* is linked to biofilm formation and adherence onto respiratory tract epithelial cells.** *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 55, n. 1, pg. 69-79, fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.01.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118221000219>. Acesso em: 15 abr. 2024.
39. CHO, Yoo Jin; *et.al.* **Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 64, n. 2, p. 185-190, jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889309000698?via%3Dihub>. Acesso em: 16 mai. 2024.
40. CHOUDHARY, Monika; SHRIVASTAVA, Rahul; VASHISTT, Jitendraa. ***Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation: Association with Antimicrobial Resistance and Prolonged Survival under Desiccation.** *Current Microbiology*, v. 79, n. 361, out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03071-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-022-03071-5#citeas>. Acesso em: 05 mai. 2024.
41. CINCAROVA, Lenka; *et.al.* **Changes in the Expression of Biofilm-Associated Surface Proteins in *Staphylococcus aureus* Food-Environmental Isolates Subjected to Sublethal Concentrations of Disinfectants.** *BioMed Research International*, 4034517, out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/4034517>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27868063/>. Acesso em: 16 fev. 2024.
42. CONDE-PÉREZ, Kelly; *et al.* **In-Depth Analysis of the Role of the Acinetobactin Cluster in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752070>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34675911/>. Acesso em: 23 jan. 2024.
43. CONGRESSO EUROPEU DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA E DOENÇAS INFECCIOSAS, 29., 2019, Amsterdã, Holanda. **Anais do 29º Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas.** p. P0947. Tema: Epidemiologia molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenem e identificação do novo clone internacional IC9: Resultados de um estudo de vigilância mundial (2012–2016).

44. CORREIA, B. DE C.; TRINDADE, J. K.; ALMEIDA, A. B. **Fatores Correlacionados à Automedicação entre os Jovens e Adultos: Uma Revisão Integrativa da Literatura.** *Revista de Iniciação Científica e Extensão*, v. 2, n. 1, p. 57-61, 28 jan. 2019.
45. COST, Priscila S. **Caracterização de fatores de patogenicidade em amostras de *Acinetobacter baumannii* obtidas de um hospital universitário em Belo Horizonte, Minas Gerais.** 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/42462/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Priscila-Vers%C3%A3o%20final%20CORRIGIDA.pdf>.
46. CUNHA, Josiane P.N da. **Avanços na terapia antimicrobiana em infecções causadas pela espécie *Acinetobacter baumannii*.** 2019. Monografia (Especialista em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/37391/1/Avan%C3%A7os%20na%20terapia%20antimicrobiana%20em%20infec%C3%A7%C3%B5es%20causadas%20pela%20esp%C3%A9cie.pdf>.
47. DA MOTA, Fernanda S.; DE OLIVEIRA, Heloísa A.; SOUTO, Renata C.F. **Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva.** *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, nov. 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800740. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/artigos/perfil-e-prevalencia-de-resistencia-aos-antimicrobianos-de-bacterias-gram-negativas-isoladas-de-pacientes-de-uma-unidade-de-terapia-intensiva/>. Acesso em: 20 mar. 2024.
48. DARREN, Wong; *et.al.* **Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: A Century of Challenges.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 409-447, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-16>. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00058-16?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 13 abr, 2024.
49. DE CAMPOS, Paola A.; *et.al.* **Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes.** *Current Microbiology*, v. 72, p. 617-627, fev. 2016. DOI:

- <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0996-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-016-0996-x#citeas>. Acesso em: 27 mai. 2024.
50. DENG, Mei; *et.al.* **Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 297-303, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01727-13>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24165187/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
51. DIANCOURT, Laure; *et.al.* **The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool.** *PLOS One*, v. 5, n. 4, e10034, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383326/>. Acesso em: 04 mai. 2024.
52. DIJKSHOORN, Lenie; NEMEC, Alexandre; SEIFERT, Harald. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 939-951, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1789#citeas>. Acesso em: 07 fev. 2024.
53. DOI, André M.; CARVALHAES, Cecília G. **Gene MCR-1 e Resistência à Polimixina.** 2017. Artigo– Comitê Científico de Microbiologia da SBPC/ML, 2017 Disponível em: https://bibliotecasbpc.org.br/arcs/pdf/Comentario_Polimixina_12_07_17.pdf.
54. DONLAN, Rodney M. **Biofilms: microbial life on surfaces.** *Emerg Infect Dis*, v. 8, n. 9, p. 881-890, set. 2002. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194761/>. Acesso em: 08 fev. 2024.
55. EICHENBERGER, Emily M.; THADEN, Joshua T. **Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria.** *Antibiotics (Basel)*, v. 8, n. 2, p. 37, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020037>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30959901/>. Acesso em: 17 fev. 2024.
56. ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 2017. **Biofilme em tubo orotraqueal e sua relação com a presença de leveduras na secreção traqueal.** <https://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123456789/1976/1/epcc--80101.pdf>
57. EZE, Emmanuel C.; *et.al.* ***Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments.** *Infect Drug Resist.*, v. 11, p. 2277-2299, nov. 2018. DOI:

- <https://doi.org/10.2147/idr.s169894>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30532562/>. Acesso em: 18 mar. 2024.
58. FERNANDES, Miriam R.; *et.al.* **Novel mcr-5.3 variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 12, p. 3520-3522, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky341>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30202925/>. Acesso em: 22 abr. 2024.
59. FERREIRA, Joana A.B.; *et.al.* **Diversidade Genética e Produção de Biofilme de Amostras de *Pseudomonas Aeruginosa* Isoladas da Água Utilizada em Unidades de Terapia Renal Substitutiva.** *Analytica*, n. 65, jul. 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8504>. Acesso em: 23 mai. 2024.
60. FIESTER, Steven E.; *et.al.* **Iron-Regulated Phospholipase C Activity Contributes to the Cytolytic Activity and Virulence of *Acinetobacter baumannii*.** *PLOS One*, v. 11, n. 11, e0167068, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0167068>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119829/>. Acesso em: 15 abr. 2024.
61. FLEMMING, H.-W., & WUERTZ, S. **Bacterial biofilms: an update.** *Environmental Microbiology Reports*, 11(5), 457-471. 2019. DOI:10.1111/1758-2229.12780.
62. FLORES-DÍAZ, Marietta.; *et.al.* **Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 3, p. 597-628, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/membr.00082-15>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27307578/>. Acesso em: 07 jun. 2024.
63. FONSECA, Érica L.; *et.al.* **Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-72 and blaCTX-M-115 in the Brazilian Amazon region.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 20, p. 18-21, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519301584?via%3Dihub>. Acesso em: dia mês. 2024.
64. FOURNIER, Pierre-Edouard; *et.al.* **Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *PLOS Genetics*, v. 2, n. 1, e7, jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16415984/>. Acesso em: 12 mar. 2024.
65. FRANÇA, Rafaela O. **Fatores de virulência e resistência de amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*: caracterização fenotípica e genotípica e análise da**

- interferência destes fatores na evolução e resolução dos processos.** 2015. Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-AP8NS5/1/dissertacao_de_mestrado_rafaela_oliveira_fran_a.pdf
66. FUCHS, S. et al. **Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Bacteriology*, v. 189, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.00081-07>. Acesso em: 25 ago. 2014.
67. GADDY, Jennifer A.; ACTIS, Luis A. **Regulation of *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation.** *Future Microbiology*, v. 4, n. 23, pg. 273-278, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.09.5>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19327114/>. Acesso em: 15 jun. 2024.
68. GAIDHANI, Sharvari V.; et al. **Time dependent enhanced resistance against antibiotics & metal salts by planktonic & biofilm form of *Acinetobacter haemolyticus* MMC 8 clinical isolate.** *Indian Journal of Medical Research*, v. 140, n. 5, p. 665-671, nov. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311322/>. Acesso em: 11 mai. 2024.
69. GAO, Z.; JACKSON, K.M.; LESLIE, D.E. **Pitfalls in the use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for fingerprinting of gram-negative organisms.** *Pathology*, v. 28, n. 2, p. 173-177, mai. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/00313029600169823>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8743826/>. Acesso em: 02 jun. 2024.
70. GARCIA, Mariana W. **Vesículas de Membrana Externa (OMV) *Neisseria lactamica*: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante.** 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2018. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-07062019-100400/publico/Mariana_Watanabe_Garcia_Corrigida.pdf.
71. GARZONI, C. et al. ***Staphylococcus aureus*: nova evidência para persistência intracelular.** *Trends Microbiol.* 17, 59-65. 2009. DOI: 10.1016/j.tim.2008.11.005. Acesso em: 21 ago. 2024.
72. GEDEFIE, A.; et al. ***Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review.** *Infection and Drug Resistance*, v. 14, pg. 3711-3719, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147%2FIDR.S332051>. Disponível em:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8439624/#cit0025>. Acesso em: 05 mar. 2024.
73. GEISINGER, E.; ISBERG, R.R. **Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter baumannii***. *PLoS Pathog*, v. 11, n. 2, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25679516/>. Acesso em: 02 abr. 2024.
74. GERSON, S.; *et.al.* **Diversity of amino acid substitutions in PmrCAB associated with colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 3, 105862, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.105862>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857919303334>. Acesso em: 05 fev. 2024.
75. GHAFFAR, A., & GHOSH, A. **Nutrient availability and biofilm formation**. *Microbial Ecology*, 71(1), 233-242, 2016. DOI:10.1007/s00248-015-0663-2.
76. GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance**. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 3, p. 219-226, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20047818/>. Acesso em: 26 mar. 2024.
77. GORDON, R.J.; LOWY, F.D. **Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. S5, p. S350–S359, jun. 2008. Disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/46/Supplement_5/S350/472604?login=false. Acesso em: 20 ago. 2024.
78. GRANÃ-MIRAGLIA, L.; *et.al.* **Origin of OXA-23 Variant OXA-239 from a Recently Emerged Lineage of *Acinetobacter baumannii* International Clone V**. *mSphere*, v. 5, n. 1, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00801-19>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00801-19>. Acesso em: 20 mai. 2024.
79. GRANDI, G. **Bacterial surface proteins and vaccines**. *F1000 Biology Reports*, v. 2, n. 36, mai. 2010. DOI: <https://doi.org/10.3410%2FB2-36>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950030/>. Acesso em: 27 jun. 2024.
80. GREENE, C. *et al.* **The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii***. *American Journal of Infection Control*, v. 44, n. 5, pg. e65-e71, mai. 2016. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.12.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196655315012602>. Acesso em: 15 abr. 2024.
81. GUNN, John S.; BAKALETZ, Lauren O.; WOZNIAK, Daniel J. **What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 24, p. 12538-12546, jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.707547>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)40897-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)40897-X/fulltext). Acesso em: 27 mar. 2024.
82. HAMED, S.M. *et.al.* **Acinetobacter baumannii Global Clone-Specific Resistomes Explored in Clinical Isolates Recovered from Egypt.** *Antibiotics*, v. 12, n. 7, p. 1149, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071149>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/7/1149>. Acesso em: 13 jun. 2024.
83. HARDING, C.M. *et al.* **Pathogenic Acinetobacter species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 22, pg. 9075-9087, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.M117.781575>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454093/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
84. HARDING, C.M.; HENNON, S.W.; FELDMAN, M.F. **Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 2, pg. 91-102, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29249812/>. Acesso em: 16 mai. 2024.
85. HASAN, T.; CHOI, C. H.; MAN HWAN, O.H. **Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in Acinetobacter baumannii.** *Genomics & Informatics*, v. 13, n. 1, pg. 2-6, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.1.2>. Disponível em: <https://genominfo.org/journal/view.php?doi=10.5808/GI.2015.13.1.2>. Acesso em: 05 abr. 2024.
86. HAWKEY, J. *et.al.* **Evolution of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii during a prolonged infection.** *Microbial Genomics*, v. 4, n. 3, e000165, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000165>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29547094/>. Acesso em: 03 abr. 2024.
87. HIGGINS, P.G. *et.al.* **A PCR-based method to differentiate between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU.** *Clin Microbiol Infect*, v. 13, n. 12,

- p. 1199-1201, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01819.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17850345/>. Acesso em: 12 jan. 2024.
88. HIGGINS, P.G. **Molecular epidemiology of clinical, animal, and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii***. 2022. Apresentação - PEG Bad Honnef-Symposium, 2022. Disponível em: https://www.peg-symposien.org/tl_files/symposien/Symposien_2022/Vortraege%20BHS%2022/Higgins%20PEG%202022_for%20pdf.pdf.
89. HIGGINS, P.G. *et.al.* **Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 6, p. 1317, jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq123>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/65/2/233/685689?login=false>. Acesso em: 06 mai. 2024.
90. HIGGINS, P.G. *et.al.* **Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from War-Injured Patients from the Eastern Ukraine**. *Antibiotics*, v. 9, n. 9, p. 579, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090579>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/9/579>. Acesso em: 10 mai. 2024.
91. HOMENTA, H. *et al.* **The 38.8 kDa Pili Subunit Hemagglutinin Protein of *Acinetobacter baumannii* is an Adhesin Protein that can activate s-IgA Production**. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 9, n. 1, pg. 26-33, jan. 2014. DOI: [10.9790/3008-09142633](https://doi.org/10.9790/3008-09142633). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/314442681_The_388_kDa_Pili_Subunit_Hemagglutinin_Protein_of_Acinetobacter_baumannii_is_an_Adhesin_Protein_that_can_activate_s-IgA_Production. Acesso em: 28 mar. 2024.
92. HOPPER, D.C.; JACOBY, G.A. **Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1354, n. 1, p. 12-31, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190223/>. Acesso em: 09 jun. 2024.
93. HOSSAIN, Z.; FAKRUDDIN, Md. **Mechanism of Host Cell Death in Response to Bacterial Infections**. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, v. 3, n. 4, pg. 128. 2012. DOI: 10.4172/2155-9899.1000128. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access-pdfs/mechanism-of-host-cell-death-in-response-to-bacterial-infections-2155-9899.1000128.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2024.

94. HOWARD, A. *et.al.* ***Acinetobacter baumannii* – An emerging opportunistic pathogen.** *Virulence*, v. 3, n. 3, p. 243-250, mai. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.19700>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.19700>. Acesso em: 04 jan. 2024.
95. HOYLE, B.D.; COSTERTON, W. J. **Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms.** *Progress in Drug Research*, v. 37, pg. 91-105, 1991. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7139-6_2. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-7139-6_2#citeas. Acesso em: 17 mai 2024.
96. HUYS, G. *et.al.* **Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments.** *Research in Microbiology*, v. 158, n. 3, p. 228-235, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.12.011>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17350231/>. Acesso em: 08 fev. 2024.
97. IBRAHIM, M.E. **Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia: risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 18, n. 1, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186%2Fs12941-018-0301-x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317247/>. Acesso em: 03 mai. 2024.
98. IBRAHIM, S. *et.al.* **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals.** *Mol Biol Rep*, v. 48, p. 6987-6998, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8403534/>. Acesso em: 5 mar. 2024.
99. ISTIVAN, T.S.; COLOE, P.J. **Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis.** *Microbiology Society*, v. 152 (pt. 5), p. 1263-1274, mai. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28609-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16622044/>. Acesso em: 06 abr. 2024.
100. JACOBS, A.C. *et.al.* **Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis.** *Infection and Immunity*, v. 78, n. 5, p. 1952-1962, mai. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00889-09>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20194595/>. Acesso em: 19 jan. 2024.
101. JEREMIAH, C.; *et.al.* **Genomic surveillance of *Acinetobacter baumannii* in the Philippines, 2013-2014.** *Western Pac Surveill Response J*, v. 12, n. 4, p. 1-15, mês. ano. DOI: <https://doi.org/10.5365/wpsar.2021.12.4.863>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35251744/>. Acesso em: 13 mar. 2024.

102. JIMÉNEZ-CASTELLANOS, Juan-Carlos. *et.al.* **Characterization of pyridylpiperazine-based efflux pump inhibitors for *Acinetobacter baumannii***. *JAC Antimicrobial Resistance*, v. 5, n. 5, dlad112, out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fjacamr%2Fdlad112>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10594211/>. Acesso em: 10 mar. 2024.
103. JIN, J.S.; *et al.* ***Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles**. *Plos One*, v. 6, n. 2, fev. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017027>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017027>. Acesso em: 05 mar. 2024.
104. JOUYBARI, M.A. *et.al.* **Role of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylase (ArmA) in resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates against aminoglycosides**. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, e05992020, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590%2F0037-8682-0599-2020>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7849326/#B13>. Acesso em: 02 mar. 2024.
105. JUTTUKONDA, L.J.; CHAZIN, W.J.; SKAAR, E.P. ***Acinetobacter baumannii* Coordinates Urea Metabolism with Metal Import to Resist Host-Mediated Metal Limitation**. *mBio*, v. 7, n. 5, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01475-16>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27677795/>. Acesso em: 25 jan. 2024.
106. KADURUGAMUWA, J.L.; BEVERIDGE, T.J. **Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics**. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 10, pg. 2767-2774, mai. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.178.10.2767-2774.1996>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178010/>. Acesso em: 28 fev. 2024.
107. KAHL, B. *et al.* **Persistent Infection with *Small Colony Variant* Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis**. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 177, n. 4, p. 1023–1029, 1 abr. 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/177/4/1023/928888?login=false>. Acesso em: 20 ago. 2024.
108. KAHL, B.C. ***Small colony variants (SCVs) of Staphylococcus aureus* – A bacterial survival strategy**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 515-522, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.016>. Disponível em:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134813002050?via=ihub#b0485>. Acesso em: 21 fev. 2024.
109. KAHL, B.C.; BECKER, K.; LOFFLER, B. **Clinical Significance and Pathogenesis of *Staphylococcal Small Colony Variants* in Persistent Infections.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 2, p. 401-427, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00069-15>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26960941/>. Acesso em: 28 mar. 2024.
110. KAHL, B. *et.al.* **Persistent Infection with *Small Colony Variant Strains* of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 117, n. 4, p. 1023-1029, abr. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1086/515238>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/177/4/1023/928888>. Acesso em: 08 fev. 2024.
111. KALITERNA, V.; GOIC-BARISIC, I. **The ability of biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* belonging to two different European clones causing outbreaks in the Split University Hospital, Croatia.** *Journal of Chemotherapy*, v. 25, n. 1, p. 60-62, nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1179/1973947812y.0000000052>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23433447/>. Acesso em: 15 mai. 2024.
112. KAPLAN, J.B. **Antibiotic-induced biofilm formation.** *Int J Artif Organs*. v. 34, p. 737-751. DOI: <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22094552/>. Acesso em: 20 ago. 2024.
113. KARAH, N. *et.al.* **Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*.** *Drug Resist Updat.*, v. 15, n. 4, p. 237-247, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841809/>. Acesso em: 12 fev. 2024.
114. KATSUBE, T; *et al.* **Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacterial Infections: Pharmacokinetics and Safety in Subjects with Renal Impairment.** *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, n. 5, pg. 584-591, mai. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcph.841>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27874971/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
115. KHUNTAYAPORN, P.; THIRAPANMETHEE, K.; CHOMNAWANG, M.T. **An Update of Mobile Colistin Resistance in Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 12, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.882236>. Disponível em:

- <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2022.882236/full>. Acesso em: 24 abr. 2024.
116. KIEFFER, N. *et.al.* **Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered from Swine in Brazil.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 65, n. 7, e00278-18, jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FAAC.00278-18>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021659/>. Acesso em: 20 mai. 2024.
117. KIM, M. *et al.* **Distinctive Roles of Two *Acinetobactin* Isomers in Challenging Host Nutritional Immunity.** *mBio*, v. 12, n. 5, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02248-21>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34517755/>. Acesso em: 14 fev. 2024.
118. KISHK, R. *et.al.* **Prevalence of Aminoglycoside Resistance and Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Acinetobacter baumannii* Among Intensive Care Unit Patients, Ismailia, Egypt.** *Infection and Drug Resistance*, v. 14, p. 143-150, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147%2FIDR.S290584>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7838519/>. Acesso em: 07 jan. 2024.
119. KLOTZ, P. *et.al.* **Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 272, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00272>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00272/full>. Acesso em: 19 abr. 2024.
120. KON, H. *et al.* **Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test.** *BMC Microbiol*, v. 20, n. 285, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01971-9>. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-01971-9#citeas>. Acesso em: 07 jan. 2024.
121. KORONAKIS, V. *et.al.* **Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export.** *Nature*, v. 405 n. 6789, p. 914-919, jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35016007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10879525/>. Acesso em: 02 mai. 2024.
122. KRZYMINSKA, S.; FRACKOWIAK, H.; KAZNOWSKI, A. ***Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells.** *Current Microbiology*, v. 65, pg. 319-329,

- jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0159-7>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22684803/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
123. KRZYŚCIAK, P. *et al.* **Acinetobacter baumannii isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility.** *AMPIS*, v. 125, n. 11, pg. 1017-1026, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12739>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28913903/>. Acesso em: 28 mai. 2024.
124. KULKARNI, H.M.; JAGANNADHAM, M.V. **Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria.** *Microbiology Society*, v. 160, n. 10, out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.079400-0#abstract_content. Acesso em: 27 mar. 2024.
125. KULP, A.; KUEHN, M.J. **Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles.** *Annual Review of Microbiology*, v. 178, pg. 163-184, out. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525469/>. Acesso em: 30 abr. 2024.
126. LAVIGNE, Jean-Philippe. *et al.* **An adaptive response of Enterobacter aerogenes to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates.** *Revista International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 41, n. 2, pg. 130-136, fev. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.010>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23280442/>. Acesso em: 08 jan. 2024.
127. LAW, Soffi K.K; TAN, Hock S. **The role of quorum sensing, biofilm formation, and iron acquisition as key virulence mechanisms in Acinetobacter baumannii and the corresponding anti-virulence strategies.** *Microbiological Research*, v. 260, n. 127032, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127032>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35483311/>. Acesso em: 09 jan. 2024.
128. 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, n. 55, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346588/>. Acesso em: 25 mar. 2024.
129. LEE, H.-W.; *et.al.* **Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 1, p. 49-54, jan. 2008. DOI:

- <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14606455>. Acesso em: 14 mai. 2024.
130. LEUNGTONGKAM, U. *et.al.* **Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*.** *PLOS One*, v. 13, n. 12, e0208468, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208468>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521623/>. Acesso em: 16 jan. 2024.
131. LI, Dr Jian; *et.al.* **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.** *The LANCET Infectious Diseases*, v. 6, n. 9, p. 589-601, set. 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(06\)70580-1/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(06)70580-1/abstract). Acesso em: 26 jun. 2024.
132. LI, Z.; CLARKE, A.J.; BEVERIDGE, T.J. **Gram-Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria.** *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 20, pg. 5478-5483, out. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.180.20.5478-5483.1998>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107602/>. Acesso em: 15 jan. 2024.
133. LIN, Ming-Feng; LAN, Chung-Yu. **Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside.** *World Journal Clinical Cases*, v. 2, n. 12, pg. 787-814, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.12998%2Fwjcc.v2.i12.787>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266826/>. Acesso em: 24 fev. 2024.
134. LITZLER, Pierre-Yves; *et.al.* **Biofilm formation on pyrolytic carbon heart valves: Influence of surface free energy, roughness, and bacterial species.** *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 134, n. 4, p. 1025-1032, out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.06.013>. Disponível em: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(07\)01083-5/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(07)01083-5/fulltext). Acesso em: 13 mar. 2024.
135. LOCKHART, Joey S.; BURET, Andre G.; MORCK, Douglas W. **Biofilm and Biofilm Control.** *Basicmedical Key*, mai. 2021. Disponível em: <https://basicmedicalkey.com/biofilm-and-biofilm-control/>. Acesso em: 21 jan. 2024.
136. LOEHFELM, Thomas W.; LUKE, Nicole R.; CAMPAGNARI, Anthony A. **Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated**

- Protein.** *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 3, p. 1036-1044, 16 nov. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.01416-07>. Acesso em: 29 out. 2024
137. LOPES, Adrianny S. **Caracterização de Vesículas Extracelulares de *Clostridioides difficile***. 2017. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/20161/1/ASLopes.pdf>.
138. LUPO, Agnese; HAENNI, Marisa; MADEC, Jean-Yves. **Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas spp.*** *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 3, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017>. Acesso em: 18 mai. 2024.
139. MANNIN, Andrew J.; KUEHN, Meta J. **Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense.** *BMC Microbiology*, v. 11, n. 258, dez. 2011. DOI <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248377/>. Acesso em: 15 mar. 2024.
140. MARKOGIANNAKIS, A. *et al.* **Cross-Transmission of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clonal Strains Causing Episodes of Sepsis in a Trauma Intensive Care Unit.** *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(05), 410–417. 2008/ DOI:10.1086/533545.
141. MARTÍNEZ, J.L.; BAQUERO, F. **Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space.** *Ups J Med Sci*. 2014. DOI: 10.3109/03009734.2014.901444.
142. MARTINS, Andreza F.; *et.al.* ***Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos no Brasil: perfil de suscetibilidade e diversidade de oxacilinases.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 53, n. 6, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170057>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/9FzyLsv6QZ6CqwRyH5yFqxB/>. Acesso em: 4 jun. 2024.
143. MASSEY, Ruth C.; PEACOCK, Sharon J. **Antibiotic-resistant sub-populations of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* confer population-wide resistance.** *Current Biology*, vol. 12, n. 20, p. R686-7, 2002. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)01205-8. Acesso em: 21 ago. 2024.
144. MEA, Hing J.; YONG, Phelim V.C; WONG, Eng H. **An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation.** *Microbiological*

- Research*, v. 247, 126722, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>.
Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501321000288?via%3Dihub>.
Acesso em: 27 mar. 2024.
145. MEA, Hing J.; YONG, Phelim V.C; WONG, Eng H. **An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation.** *Microbiological Research*, v. 247, n. 126722, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>.
Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501321000288?via%3Dihub>.
Acesso em: 25 jun. 2024.
146. MELO, R. C.; PAUFERRO, M. R. V. **Health education to provide the rational use of medications and the pharmacist's contributions in this context.** *Brazilian Journal of Development*, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 32162–32173, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n5-603.
147. MELTER, O.; RADOJEVIC, B. **Small colony variants of *Staphylococcus aureus* — review.** *Folia Microbiologica*, v. 55, p. 548-558, jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0089-3>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-010-0089-3>. Acesso em: 03 fev. 2024.
148. MENDES, Caio; *et.al.* **Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 9, n. 1, fev. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000100008>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/bjid/a/BKLN7sKjjgPk4yLPn3dzzyn/?lang=en#>. Acesso em: 06 mai. 2024.
149. MENDES, Carlos A.C.; BURDMANN, Emmanuel A. **Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 55, n. 6, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302009000600023>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/ramb/a/ZNvsbTFvfcgSYp854CKDVcL/#>. Acesso em: 11 mai. 2024.
150. MENEGHETTI, Karine L. **Identificação da espécie e análise fenotípica da expressão de proteínas de membrana externa em isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter sp.*** 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. Disponível em:
<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/131675/000981072.pdf?sequence=1>.

151. MONTEIRO R. F. dos S. et al. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, n. 53, p. e3597, 23 jul. 2020. DOI:
152. MORAIS, Ana J.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana do cinamaldeído em isolados nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/32343/3/2018_dis_ajamorais.pdf.
153. MOUBARECK, Carole A.; HALAT, Dalal H. **Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen.** *Antibiotics (Basel)*, v. 9, n. 19, pg. 119, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fantibiotics9030119>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7148516/#B70-antibiotics-09-00119>. Acesso em: 16 mar. 2024.
154. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Medica**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
155. MUSSI, María A.; et al. **CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for l-ornithine uptake.** *FEBS Letters*, v. 581, n. 29, pg. 5573-5578, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.063>. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2007.10.063>. Acesso em: 28 mar. 2024.
156. NASR, P. **Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *The Journal of Hospital Infection*, v. 104, n. 1, p. 4-11, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.09.021>. Disponível em: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(19\)30409-8/abstract](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(19)30409-8/abstract). Acesso em: 25 mai. 2024.
157. NEMEC, Alexandr; DIJKSHOORN, Lenie; VAN DER REIJDEN, Tanny J.K. **Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 147-153, fev. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05445->. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14729937/>. Acesso em: 03 mar. 2024.

158. NESHA, Maherun.; ANWAR, Shaheda.; SALEH, Ahmed Abu. ***Acinetobacter baumannii*: Identification, Antibiotic Sensitivity and Biofilm Formation in Different Clinical Samples.** *Bangladesh J Med Microbiol*, v. 12, p. 4-9, jul. 2018. Acesso em: 20 ago. 2024.
159. NITHIN, Sam R.; *et.al.* **The potential of different molecular biology methods in tracking clones of *Acinetobacter baumannii* in an ICU setting.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 67, n. 9, p. 1340-1347, set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000797>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30016226/>. Acesso em: 07 mai. 2024.
160. NOAMAN, Khaled A.; *et.al.* **The transmutation of *Escherichia coli* ATCC 25922 to small colony variants (SCVs) *E. coli* strain as a result of exposure to gentamicin.** *Journal of Infection and Public Health*, v. 16, n. 11, p. 1821-1829, nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.08.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034123002915?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2024.
161. NOVOVIC, Katarina; JOVICIC, Branki. **Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology.** *Antibiotics (Basel)*, v. 12, n. 3, p. 516, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030516>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10044110/>. Acesso em: 21 mai. 2024.
162. OLAITAN, Aboila O.; MORAND, Serge; ROLAIN Jean-Marc. **Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria.** *Front. Microbiol.*, v. 5, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2014.00643/full>. Acesso em: mar 16. 2024.
163. OLIVEIRA, S.C. **Estudo da monitorização farmacocinética de amicacina no tratamento de infecções nosocomiais por *Acinetobacter baumannii*.** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2015. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/28941>.
164. OLIVEIRA, Vanessa Castro de. *et al.* **Perfil da automedicação em uma farmácia comunitária no município de Itapipoca-CE.** *Revista Expressão Católica Saúde*, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 64-70, sep. 2018. ISSN 2526-964X. DOI: <http://dx.doi.org/10.25191/recs.v3i1.2135>.

165. OLIVEIRA, Warley S. de. **Análise do perfil de virulência de *Acinetobacter baumannii* resistente à polimixina B**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnológicas) – Universidade Católica de Brasília, 2023. Disponível em: <https://bdtd.ucb.br:8443/jspui/bitstream/tede/3200/2/WarleySilv%C3%A9rioDissertacao2023.pdf>.
166. ONYANGO, Laura A.; *et.al.* **Effect of Low Temperature on Growth and Ultra-Structure of *Staphylococcus spp.*** PLOS One, v. 7, n. 1, e29031, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029031>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265459/>. Acesso em: 23 fev. 2024.
167. PAVEL, A. B., & VASILE, C. I. **PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics**. *BMC bioinformatics*, 13, 9. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>.
168. PELEG, Anton Y.; *et.al.* ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n.3, p. 538-582, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-07>. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00058-07?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 08 jan. 2024.
169. PEREIRA, Daniel A. **Quorum sensing em cianobactérias**. 2014. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9NFKZN/1/doutorado_daniel_pereira.pdf.
170. PEREIRA, Daniella C.R. **Caracterização da resistência de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos e desinfetante hospitalar**. 2013. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8669>.
171. PISSULIN, Camila; SIQUEIRA, Carolina; GIRARDELLO, Raquel. **Avaliação da Transcrição do Sistema de Bomba de Efluxo Adeabc em Isolados Clínicos de *Acinetobacter Baumannii* Antes e Após a Indução In Vitro de Resistência à Polimixina B**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade São

- Francisco, 2021. Disponível em: <https://www.usf.edu.br/galeria/getImage/768/608778391355422.pdf>.
172. POGUE, Jason M.; *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, surveillance and management.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 11, n. 4, p. 383-393, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1586/eri.13.14>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.13.14?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 23 mar. 2024.
173. POOLE, K. **Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.** *Clin Microbiol Infect*, v. 10, n. 1, p. 12-23, jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14706082/>. Acesso em: 05 jun. 2024.
174. PORTELA, A. da S. *et al.* **Prescrição médica: orientações adequadas para o uso de medicamentos?.** *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010. Vol. 15(suppl3):3523-3528. DOI: 10.1590/S1413-81232010000900027. Acesso em: 25 ago. 2024.
175. POULOU, Aggeliki; *et al.* **Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 10, pg. 3176-3182, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FJCM.01244-13>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811621/>. Acesso em: 24 mai. 2024.
176. Proctor, R.A. *et al.* **Infecções persistentes e recorrentes associadas a variantes de pequenas colônias de *Staphylococcus aureus*.** *Clin. Infect. Dis.* 20, 95–102. 1995. DOI: 10.1093/clinids/20.1.959. Acesso em: 25 ago. 2024.
177. PROCTOR, Richard A.; *et.al.* **Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections.** *Nat Rev Microbiol.*, v. 4, n. 4, p. 295-305, abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16541137/>. Acesso em: 25 fev. 2024.
178. PROCTOR, Richard A.; *et.al.* **Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance.** *Clin Infect Dis*, v. 27, n. 1, p. S68-74, ago. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1086/514906>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9710673/>. Acesso em: 27 jan. 2024.
179. RAFEI, Rayane; *et al.* **First report of bla_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war.** *International Journal of Infectious Diseases*, v. 21, pg. 21-23, abr. 2014. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.jiid.2014.01.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197121400040X>. Acesso em: 24 abr. 2024.
180. RAMEZANALIZADEH, Fatemeh; *et al.* **Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*.** *Vaccine - Elsevier*, v. 38, n. 34, pg. 5436-5446, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.052>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0264410X20308380?via%3Dihub#preview-section-introduction>. Acesso em: 25 jun. 2024.
181. RAMOS-GALLARDO, Guillermo. **Chronic Wounds in Burn Injury: A Case Report on Importance of Biofilms.** *World J Plast Surg*, v. 5, n. 2, p. 175-180, mai. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5003954/>. Acesso em: 16 mês. 2024.
182. RAO, Srinivasa R.; *et al.* **Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26, n. 4, pg. 333-337, dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.4103/0255-0857.43566>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18974485/>. Acesso em: 24 mai. 2024.
183. RAU, Renata B.; *et.al.* ***Salmonella enterica mcr-1* Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization.** *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 17, n. 3, p. 202-208, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2700>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31556704/>. Acesso em: 23 jan. 2024.
184. REPIZO, Guillermo D.; *et.al.* **Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence.** *PLoS One*, v. 10, n. 9, e0138265, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138265>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401654/>. Acesso em: 05 jun. 2024.
185. RODRIGUES, Ana Paula F. **Eficácia e Segurança de Polimixinas no Tratamento de Infecções Por Microrganismos Produtores de Carbapenemase: Revisão da Literatura.** 2016. Trabalho (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, 2016. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/13727/1/2016_AnaPaulaFerreiraRodrigues.pdf.
186. RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús.; *et.al.* **Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications.** *Clinical microbiology and*

- infection*, v. 14(3), p. 276-278. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18190568/>. Acesso em: 20 ago. 2024.
187. ROMANIN, Priscila; *et.al.* **Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Hospital from Brazil: The Importance of Carbapenemase Encoding Genes and Epidemic Clonal Complexes in a 10-Year Study.** *Microbial Drug Resistance*, v. 25, n. 9, p. 1365-1373, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0002>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31361565/>. Acesso em: 09 fev. 2024.
188. ROSA, Larissa N.; *et.al.* **Ventilator-associated pneumonia from polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 13, e555101321480, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21480>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21480>. Acesso em: 15 mai. 2024.
189. ROY, Subhasree.; *et.al.* **Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection.** *Front Med (Lausanne)*, v. 9, n. 793615, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.793615>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35402433/>. Acesso em: 25 jan. 2024.
190. RUZIN, Alexey; KEENEY, David; BRADFORD, Patricia A. **AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 1001-1004, mai. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm058>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17363424/>. Acesso em: 04 abr. 2024.
191. RYDEL, Timothy J.; *et.al.* **The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad.** *Biochemistry*, v. 17, n. 2, p. 54-58, fev. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi027156r>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12779324/>. Acesso em: 13 abr. 2024.
192. SANDKVIST, M. **Type II secretion and pathogenesis.** *Infection and Immunity*, v. 69, n. 6, pg. 3523-3535, jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.69.6.3523-3535.2001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11349009/>. Acesso em: 09 mar. 2024.
193. SAROJ, Sunil D.; RATHER, Philio N. **Streptomycin Inhibits Quorum Sensing in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 1926-1929, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02161-12>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02161-12>. Acesso em: 18 fev. 2024.

194. SATO, Yoshinori. **Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation.** *PLoS One*. 13 (3), p. 1-18, mar 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194556>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29554105/>. Acesso em: 20 ago. 2024.
195. SEGGEWIB, Jochen; *et.al.* **Reporter Metabolite Analysis of Transcriptional Profiles of a *Staphylococcus aureus* Strain with Normal Phenotype and Its Isogenic *hemB* Mutant Displaying the Small-Colony-Variant Phenotype.** *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 22, p. 7765-7777, nov. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00774-06>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00774-06>. Acesso em: 18 mai. 2024.
196. SENDI, Parham. PROCTOR, Richard A. ***Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants.** *Trends Microbiol*, v. 17, n. 2, p. 54-58, fev. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19162480/>. Acesso em: 17 mar. 2024.
197. SHAW, K.J.; *et.al.* **Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.** *Microbiological Reviews*, v. 57, n. 1, p. 138-163, mar. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8385262/>. Acesso em: 18 abr. 2024.
198. SILVA, A.S. *et al.* **Indicadores do uso de medicamentos na atenção primária de saúde: uma revisão sistemática.** *Rev. Panam Salud Pública*. 2017;41:132. DOI: 10.26633/RPSP.2017.132.
199. SILVA, Mirian C.B da. **Fatores de risco para *Acinetobacter baumannii* em isolados de pacientes em uma unidade de terapia intensiva de um hospital público do Paraná.** 2022. Dissertação (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2022. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/5980/5/Mirian_Silva_2022.pdf.
200. SILVA, Roberto. **A Importância do *Acinetobacter baumannii* na Infecção Adquirida nos Cuidados de Saúde.** 2009. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto, 2009. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/21147/2/A%20Importancia%20do%20Acinetobacter%20baumannii%20na%20IACS%20cor.pdf>.

201. SILVADO, A.S. **Biofilme misto em cateter venoso central com ênfase em *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans***. Trabalho de Conclusão - Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/51490/1/Biofilme%20misto%20em%20cateter%20venoso%20central%20com%20%20C3%AAAnfase%20em%20Staphylococcus%20aureus%20e%20Candida%20albicans.pdf>
202. SMANI, Younes; DOMÍNGUEZ-HERRERA, Juan; PACHÓN, Jerónimo. **Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 8, pg. 1110-1119, abr. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq159>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21357946/>. Acesso em: 17 fev. 2024.
203. SOARES, Cynthia R.P. **Infecção de corrente sanguínea em pacientes oncológicos com patógenos bacterianos e fúngicos multirresistentes, genes de resistência, mortalidade, tempo e custo hospitalar**. 2022. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/46525/1/TESE%20Cynthia%20Regina%20Pedrosa%20Soares.pdf>.
204. SOUZA, DC; COGO, LL; FILHO, Nelson A.R. **Colônias variantes pequenas de *Staphylococcus aureus*: um novo alvo em Fibrose Cística**. *Rev Panam Infectol*. 2016;18(1):39-45. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/309838824_Colonias_variantes_pequenas_de_Staphylococcus_aureus_um_novo_alvo_em_Fibrose_Cistica
205. SRINIVASAN, Vijaya B.; RAJAMOHAN, Govindan; GEBREYES, Wondwossen A. **Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 12, p. 5312-5316, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00748-09>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19770280/>. Acesso em: 12 jan. 2024.
206. STAPPER, Andres P.; *et.al.* **Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation**. *J Med Microbiol*, v. 53, pt. 7, p. 679-690, jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45539-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15184541/>. Acesso em: 07 jan. 2024.

207. Tabela Pontos de Corte Clínicos. **BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2024. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Acesso em: 07 mar. 2024.
208. TACCONELI, Evelina; *et.al.* **Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis**. *Lancet Infect Dis*, v. 18, n. 3, p. 318-327, mar. 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30753-3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29276051/>. Acesso em: 22 abr. 2024.
209. TAKAGI, Elizabeth H. **Caracterização molecular e fenotípica de amostras bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii***. 2011. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, 2011. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-22122011-085102/publico/Tese_Elizabeth_Harummy_Takagi.pdf.
210. TEIXEIRA, Aline B. **Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* em dois hospitais de Porto Alegre**. 2013. Dissertação (Título de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/72419>.
211. TEWARI, Rachna.; *et.al.* **Antimicrobial Susceptibility Patterns of an Emerging Multidrug Resistant Nosocomial Pathogen: *Acinetobacter baumannii***. *Malays J Med Sci*, v. 25, n. 3, p. 129-134, mai. 2018. DOI: <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.3.13>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30899194/>. Acesso em: 18 jun. 2024.
212. TIWARI, Vishvanath; *et al.* **Comparative Proteomics of Inner Membrane Fraction from Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* with a Reference Strain**. *PLOS ONE*, v. 7, n. 6, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039451>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383706/>. Acesso em: 16 fev. 2024.
213. TRABER, K. E. *et al.* **agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates**. *Microbiology* (Reading, England), v. 154, n. Pt 8, p. 2265–2274, 1 ago. 2008. DOI: 10.1099/mic.0.2007/011874-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667559/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

214. TUCHSCHERR, L. *et al.* **Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence.** *The Journal of Infectious Diseases*. v. 202- 207, p. 1031-1040. 2011. DOI:10.1086/656047\ . Acesso em: 21 ago. 2024.
215. TUCHSCHERR, L. *et al.* **Troca de fenótipo do *Staphylococcus aureus*: uma estratégia bacteriana eficaz para escapar da resposta imune do hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica.** *EMBO Molecular Medicine*. 3, 129-141. 2011 DOI: 10.1002/emmm.201000115. Acesso em: 21 ago. 2024.
216. TUCHSCHERR, Lorena; LÖFFLER, Bettina; PROCTOR, Richard A. **Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs).** *Front. Microbiol.*, v. 11, 1028, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32508801/>. Acesso em: 21 jun. 2024.
217. VALÉCIO, Marcelo de. **OMS alerta: em 2050 superbactérias devem matar uma pessoa a cada três segundos.** *Instituto De Ciência Tecnologia e Qualidade – Farmácia Clínica*. Goiás, p. 14, ago. 2021. Disponível em: <https://ictq.com.br/farmacia-clinica/3166-oms-alerta-em-2050-superbacterias-matarao-uma-pessoa-a-cada-tres-segundos>. Acesso em: 15 abr. 2024.
218. VETTING, Matthew W. *et al.* **Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 433, n. 1, p. 212-226, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15581578/>. Acesso em: 24 mai. 2024.
219. VENKATARAMANA, G.P. *et al.* **Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.** *J Lab Physicians*. 2022. 9;14(3):271-277. DOI: 10.1055/s-0042-1742636. PMID: 36119417; PMCID: PMC9473940.
220. VISCA, Paolo; SEIFERT, Harald; TOWNER, Kevin J. ***Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health.** *IUBMB Life*, v. 63, n. 12, p. 1048-1054, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.534>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22006724/#:~:text=The%20genus%20Acinetobacter%20comprises%20a,%2Drelated%2C%20infections%20in%20humans>. Acesso em: 11 mai. 2024.
221. VON EIFF, C. *et al.* **Desenvolvimento de variantes de pequenas colônias resistentes à gentamicina de *Staphylococcus aureus* após implantação de esferas de**

- gentamicina em osteomielite como uma possível causa de recorrência.** *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, v. 136, p. 268–271. 1998. DOI: 10.1055/s-2008-1054234. Acesso em: 21 ago. 2024.
222. WANG, Qian.; *et.al.* **Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaA_{DBC}-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*.** *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 6, p. 2707-2711, jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01565-09>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20231401/>. Acesso em: 20 ago. 2024.
223. WEBER, Brent S.; *et.al.* **Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter*.** *PLoS One*, v. 8, n. 1, e55142, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0055142>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554697/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
224. WEBER, Brent S.; HARDING, Christian M.; FELDMAN, Mario F. **Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond.** *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 198, n. 6, p. 880-887, mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00231-24>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00906-15>. Acesso em: 19 mai. 2024.
225. WEI, Qing; MA, Luyan Z. **Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 10, p. 20983-21005, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>. Acesso em: 26 jun. 2024.
226. WHO. **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.** 2024. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 16 dez 2024.
227. WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; TICHY, H.V.; SCHON, G. **Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR fingerprinting.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 11, p. 4066-4071, nov. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1128%2Faem.60.11.4066-4071.1994>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201937/>. Acesso em: 11 jun. 2024.
228. WRIGHT, G.D.; THOMPSON, P.R. **Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism.** *Frontiers in Bioscience-Landmark*, v. 4, n. 4, p. 9-21,

- jan. 1999. DOI: <https://doi.org/10.2741/wright>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9872733/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
229. XIAO, Dong; *et.al.* **Prognosis of patients with *Acinetobacter baumannii* infection in the intensive care unit: A retrospective analysis.** *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 13, n. 4, p. 1630-1633, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892%2Fetm.2017.4137>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5377569/>. Acesso em: 24 mai. 2024.
230. YAN, Jing; BASSLER, Bonnie L. **Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms.** *Cell Host & Microbe*, v. 26, n. 1, p. 15-21, jul. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/334378919_Surviving_as_a_Community_Antibiotic_Tolerance_and_Persistence_in_Bacterial_Biofilms. Acesso em: 15 fev. 2024.
231. YANG, Cheng-Hong; *et.al.* **Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation.** *Molecules*, v. 24, n. 10, p. 1849, mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24101849>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091746/>. Acesso em: 05 abr. 2024.
232. ZEIGHAMI, Habib; *et al.* **Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients.** *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 629, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4272-0#citeas>. Acesso em: 28 mai. 2024.
233. ZHANG, Rui; *et al.* **Annexin A5-Functionalized Nanoparticle for Multimodal Imaging of Cell Death.** *Molecular Imaging*, v. 12, n. 3, pg. 182-190, mai. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893065/>. Acesso em: 05 mai. 2024.
234. ZHOU, Shengzhe; *et.al.* ***Staphylococcus aureus* small-colony variants: Formation, infection, and treatment.** *Microbiological Research*, v. 260, 127040, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501322000805?via%3Dihub#bib58>. Acesso em: jun 23. 2024.
235. ZONTA, Franciele N.S; *et.al.* **Colonização por ESKAPES e características clínicas de pacientes críticos.** *Revista Enfermería Global - Revistas UM-Universidad de Murcia*, v. 19, n. 3, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.6018/eglobal.406691>. Disponível em:

https://scielo.isciii.es/pdf/eg/v19n59/pt_1695-6141-eg-19-59-214.pdf. Acesso em: 17 abr. 2024.

9. ANEXOS

ANEXO I



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

Projeto: CAAE – 01402312.6.0000.5149

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

DECISÃO

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

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



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II

GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

FHEMIG Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

Carta de Anuência – 017/2019

Em princípio, concordamos em participar do projeto de pesquisa intitulado *“Investigação do possível efeito sinérgico da minociclina com antimicrobianos das classes das polimixinas, quinolonas e carbapenêmicos em isolados clínicos de Acinetobacter baumannii multirresistentes”* sob a responsabilidade do pesquisador Magna Cristina de Paiva.

Conforme parecer do CEP-UFSJ e do CEP-Fhemig, esta pesquisa não requer aprovação do Comitê de Ética. No entanto, salientamos que o projeto somente será iniciado em qualquer uma das Unidades da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais após aprovação pela Gerência de Ensino e Pesquisa da Fhemig quanto aos aspectos técnicos, de risco estratégico e de potencial de patentes. Tal decisão está baseada na Carta CONEP nº 0212, de 2010.

A Fhemig, enquanto Instituição Coparticipante, conhecendo a Resolução CONEP nº 466, de 2012, está ciente de suas responsabilidades no resguardo da segurança e do bem estar dos sujeitos de pesquisa que possam vir a ser nela recrutados por esse projeto.

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2019

Aline Branco Macedo

Gerente de Ensino e Pesquisa

Diretoria de Gestão de Pessoas

Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais