

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

RAFAELA OLIVEIRA FRANÇA

**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**

BELO HORIZONTE

2015

RAFAELA OLIVEIRA FRANÇA

**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**

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

Orientador: Prof. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

BELO HORIZONTE

2015

França, Rafaela Oliveira.

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/Rafaela Oliveira França – 2015, 136f.

Orientadora: Simone Gonçalves dos Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Biológicas.

Bibliografia:

1. Microbiologia 2. Infecções relacionadas à assistência à saúde

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

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

- Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias
- Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

**Laboratório de Patologia das Leishmanioses, Departamento de Patologia,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**

- Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

**Programa de Pós Graduação em Infectologia e Medicina Tropical,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais**

- Guilherme Luiz Milanez

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Alverina, meu amor maior, pelo apoio irrestrito em todos os momentos desta caminhada.

Ao meu irmão Renné, por ser um exemplo acadêmico para mim e tantos outros e à minha cunhada Sílvia por todo carinho.

Aos meus familiares, que sempre incentivaram minha formação acadêmica desde as primeiras leituras e ao Chewbacca pela fiel companhia em todas as madrugadas.

Às minhas grandes amigas Ana Luiza Gonçalves, Ana Menezes, Lorena Dantas, Mariana Melo, Maria Izabella Medeiros, Natália Caixeta e Raquel Peixoto, que tanto me incentivaram e aliviaram meu cansaço com boas conversas e muitas risadas.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves dos Santos, pela orientação no desenvolvimento desta pesquisa, pelo investimento em minha vida acadêmica e por me proporcionar tamanho crescimento pessoal e profissional nos anos de convívio.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre, pelas valiosas discussões sobre diferentes aspectos deste trabalho e de tantos outros temas relacionados, sempre tão gentil e disponível.

Ao meu querido colaborador, Prof.Dr.Ricardo Gonçalves, que me acolheu com tanto carinho e dedicação no Laboratório de Patologia de Leishmanioses (LPL) e me fez dar os primeiros passos no mundo da biologia celular.

À Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Bonfim, pela preciosa colaboração na análise de clonalidade das amostras.

À Prof^a. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, grande inspiração pessoal e profissional para qualquer um que tenha tido o privilégio do convívio.

Aos Professores Dr. Luiz de Macêdo Farias e Dr^a.Paula Prazeres Magalhães, pela companhia em todas as manhãs, pelo grande incentivo e por viabilizar toda a infraestrutura para que este trabalho tenha sido desenvolvido.

Ao Guilherme Milanez, pela colaboração na investigação epidemiológica dos casos incluídos neste estudo.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Cristina de Oliveira, minha guru profissional desde a graduação, pela escuta nos dias ruins, pelas risadas nos dias bons e pelos conselhos de sempre que levarei por toda a vida.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Beleza, pelo proveitoso e prazeroso acompanhamento na disciplina Treinamento Didático.

Aos Professores Jonathas Abrahão, Flávio Guimarães da Fonseca, Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Daniele da Glória de Souza, Giliane Trindade e Jacques Nicoli pela disponibilidade e atenção em todos os momentos que os requisitei.

À minha grande amiga Dr^a. Fabiana Magalhães Coelho, pelas risadas, conselhos e “socorros” de todas as horas.

Aos amados amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, em especial à Mariana Vaz, João Fernando, Sílvia Pietra e Augusto à Caroline de Paula e Renata Gomes, pessoas maravilhosas que aguentaram meu humor atípico e que tanto me ensinaram e me ajudaram nestes anos de convivência. Sou eternamente grata!

Às minhas alunas de iniciação científica, Thaís Silva, Fernanda Braga e Priscila Costa, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos queridos integrantes do LPL pela inestimável colaboração, amizade e paciência. Ao Prof.Dr. Wagner Tafuri pela recepção no LPL. À Tassiane Assíria, que me recebeu com tanto carinho e disponibilidade, sempre pronta a sanar minhas dúvidas e a me socorrer quando foi necessário. À Flávia Oliveira, grande parceira de bancada, por toda ajuda nos intermináveis experimentos com lamínulas, que acabavam se transformando em felizes momentos de companheirismo. Ao Vítor Barbosa, por transmitir tanta serenidade, incentivo e pela assessoria em vários e vários cálculos. Ao Greg, pelas interessantes discussões nas manhãs, tardes e noites no LPL e por todos os conselhos acadêmicos. À Carolina, pelos puxões de orelha, pelos quebra-galhos e por ter sido tão paciente comigo. À Lucélia, Isabela, Frederico, Kléber, Quézia, Joab, Ramon, Aldair, Fernanda, Larissa, Bianca, sempre prestativos e dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Remo Russo e ao Matheus de Mattos, do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, por terem cedido as linhagens celulares utilizadas neste estudo.

Ao Jamil Silvano e a todos os colegas do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas por viabilizarem as leituras dos resultados de biofilmes em microplacas de poliestireno.

À Prof^a. Dra. Vera Lúcia dos Santos por me ceder acesso aos equipamentos do laboratório sempre que foi necessário. Ao Marcus Vinícius Souza pelas valiosas sugestões nos experimentos de biologia molecular.

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia de Microrganismos e do Laboratório de Micologia, em especial a Leonardo Acúrcio, Marliete Carvalho, Rafael Bastos e Juliana Ribeiro por todo auxílio.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Comparada, em especial a Mateus Laguardia, Lorena Falabella, Aline Barbosa, Leandro Vida e Tânia Mara e Luis Adan pelas orientações diversas, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos Vinícius Cotta, Fernando Reis, Douglas Boniek, Pedro Augusto, e Andrea Cursino pelas animadas conversas pelos corredores do ICB.

À Turma n°.146 do curso de Medicina da UFMG, em especial aos meus queridos “alunos” da Turma B de Microbiologia Médica, por me proporcionarem tantos aprendizados no campo da docência.

À Roberta Vieira e Síntia Evangelista pelo companheirismo de todas as horas.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial à Patrícia e ao Tiago, sempre tão atenciosos e prestativos.

Aos meus antigos e novos coordenadores Carlos Starling, Maria Angélica Marcondes, Cátia Xavier e Sônia Queiroz, que viabilizaram a adequação de minha carga horária ao cumprimento dos créditos propostos pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

À toda equipe da URS Saudade, em especial à Lina e Cátia, pessoas maravilhosas que tanto me apoiaram em todas as etapas desta pesquisa com “os bichos” e que foram essenciais na finalização deste trabalho, sempre compreensivas e preocupadas com meu bem estar. Agradeço ainda à Valéria e ao Mateus pela amizade e incentivo de todas as horas.

Aos amigos Cristiano Oliveira, Daniel Ribeiro e Rafael Coimbra, que mesmo de longe sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso.

À Drielly Lima, Paula Santos, Raphael Silva e Simony Gonçalves, cujo apoio foi fundamental na etapa final deste trabalho.

À Fernanda Fuscaldi e Raquel Gonçalves, que sempre estimularam todas as minhas empreitadas acadêmicas, com muito carinho e companheirismo.

Aos pacientes participantes do estudo, que sempre estiveram em meus pensamentos durante todo este processo...

E à Deus, em Seus diversos nomes e conceitos, por ter colocado todas estas pessoas em meu caminho.

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara”.

(José Saramago)

RESUMO

O sucesso das infecções por *Acinetobacter baumannii* pode ser atribuído a diversos fatores de virulência, como sua habilidade em formar biofilmes, aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas; seu repertório de mecanismos de resistência a antimicrobianos e sua habilidade em adquirir material genético de outros microorganismos, promovendo sua sobrevivência, sob pressão seletiva de antimicrobianos. Buscou-se avaliar, por parâmetros fenotípicos e genotípicos, a presença de fatores de virulência em amostras de *Acinetobacter baumannii* recuperadas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e investigar a associação desses fatores com alguns desfechos clínicos. Foram avaliadas 62 amostras clínicas de *A.baumannii* provenientes de 37 pacientes. As amostras foram submetidas a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e verificação da expressão de metalobetalactamases pelo método ETest®. A reação em cadeia da polimerase foi realizada para detecção dos seguintes genes: *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{OXA143}, *bla*_{VIM-1}, *csuE*, *ompA* e do elemento de inserção *ISAbal1*. Foram realizados ensaios fenotípicos de formação de biofilme em microplacas de poliestireno e de indução de apoptose em células A549. A diversidade genética entre as amostras foi avaliada por ERIC-PCR. Por fim, realizou-se a caracterização clínico-epidemiológica dos pacientes e a associação entre a presença de genes de virulência e alguns desfechos clínicos. Identificaram-se altos índices de resistência aos antimicrobianos entre as amostras de *A. baumannii* avaliadas, exceto à polimixina B. Os genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51} foram encontrados simultaneamente na quase totalidade das amostras de *A. baumannii* estudadas; já os genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{OXA143} não foram identificados em nenhuma amostra. *bla*_{VIM-1} foi detectado na maioria das amostras de *A.baumannii* avaliadas, assim como *ISAbal1upstream* a *bla*_{OXA51}. Foram encontrados 03 grupos clonais distintos entre as amostras avaliadas. A ausência de *csuE* e *ompA* não alteraram a capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno pelas amostras analisadas. A indução de apoptose em células A549 ocorreu independente da presença de *ompA*, mas amostras positivas para tal gene foram capazes de reduzir a contagem celular, quando comparadas às amostras *ompA* negativo testadas ($p < 0.05$). Mais de 80% das células A549 inoculadas com *A.baumannii* apresentaram morte celular por apoptose em 03 horas de incubação. Cerca de 91% e 38,2% dos pacientes que apresentaram os genes *csuE* e *ompA*, respectivamente, desenvolveram doença infecciosa por *A.baumannii*. Quando os dois genes estiveram presentes, esta porcentagem foi de

39,4%. Estes resultados reforçam a importância clínico-epidemiológica de *A.baumannii* no ambiente hospitalar e fornecem dados importantes sobre a epidemiologia molecular e expressão de genes de resistência e virulência por *A.baumannii* no cenário hospitalar brasileiro.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, fatores de virulência, epidemiologia molecular da resistência, infecção.

ABSTRACT

The success of *Acinetobacter baumannii* infections can be attributed to several virulence factors, such as their ability to form biofilms, adhere, colonize and invade human epithelial cells; their repertoire of antimicrobial resistance mechanisms and their ability to acquire genetic material from other microorganisms, promoting their survival under selective pressure of antimicrobials. The aim of this study was to evaluate, by phenotypic and genotypic parameters, the presence of virulence and resistance factors in *Acinetobacter baumannii* recovered samples of patients of the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and to investigate the association of these factors with some clinical outcomes. 62 clinical samples of *A.baumannii* from 37 patients were evaluated. The samples were subjected to antimicrobial susceptibility testing and verification of expression by metalobetalactamases Etest® method. The polymerase chain reaction was performed for the detection of the following genes: *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{OXA143}, *bla*_{VIM-1}, *csuE*, *ompA* and the insertion sequence *ISAbal*. Phenotypic assays to evaluate biofilm formation were performed in polystyrene microtiter plates and induction of apoptosis were performed in A549 cells. Genetic diversity among the samples was evaluated by ERIC-PCR. Finally, we described the clinical and epidemiological characteristics of patients and the association between the presence of virulence genes and some clinical outcomes. Were identified high rates of antimicrobial resistance between the analyzed samples of *A. baumannii* except to polymyxinB. The genes *bla*_{OXA23} and *bla*_{OXA51} were found simultaneously in almost all of *A. baumannii* studied samples; however the genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} and *bla*_{OXA143} were not identified in any sample. *bla*_{VIM-1} was detected in most samples of *A.baumannii* evaluated, as well as the *ISAbal* upstream *bla*_{OXA51}. We found 03 distinct clonal groups between the analyzed samples. The absence of *csuE* and *ompA* not altered the capacity of biofilm formation in polystyrene microplates by the analyzed samples. Induction of apoptosis in A549 cells occurred despite the presence of *ompA*, but such samples positive for gene were able to reduce cell count, compared to negative *ompA* samples tested ($p < 0.05$). More than 80% of inoculated with A549 cells *A.baumannii* showed apoptotic cell death after 03 hours of incubation. About 91% and 38.2% of patients with the *csuE* and *ompA* genes, respectively, developed infectious disease by *A.baumannii*. When the two genes were present, this percentage was 39.4%. These results reinforce the clinical and epidemiological importance of *A.baumannii* in the hospital environment and provide important data on the molecular epidemiology and

expression of resistance genes and virulence by *A.baumannii* at Brazilian hospital setting.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, virulence factors, resistance molecular epidemiology, infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Apoptose e outras modalidades de morte celular	32
Figura 2 - Mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos	37
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de Multiplex PCR para pesquisa dos genes <i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA24} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{OXA58} em amostras clínicas de <i>A.baumannii</i>	66
Figura 4–Resultado de Etest® para os antimicrobianos testados em uma das amostras clínicas de <i>A.baumannii</i> avaliadas	67
Figura 5 - Resultados para pesquisa fenotípica de metalobetalactamases em uma das amostras clínicas de <i>A.baumannii</i> avaliadas.....	68
Figura 6 – Infecção de células A549 por <i>A.baumannii</i> em lamínulas de vidro. Amostra 06, <i>ompA</i> negativo	74
Figura 7 - Infecção de células A549 por <i>A.baumannii</i> em lamínulas de vidro. Amostra 16, <i>ompA</i> positivo	75
Figura 8 - Análise da morte celular induzida pelo <i>Acinetobacter baumannii</i> em células da linhagem A549 “ <i>in vitro</i> ”	80
Figura 9 - Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE mostrando as relações entre as amostras de <i>A.baumannii</i> avaliadas	92
Gráfico 1 – Perfil genotípico de marcadores de resistência a antimicrobianos e virulência das amostras de <i>A.baumannii</i> avaliadas	69
Gráfico 2 – Formação de biofilme em microplacas de poliestireno pelas 62 amostras clínicas de <i>A.baumannii</i> avaliadas	71
Gráfico 3 - Comparação entre o número de células A549 sobreviventes em diferentes concentrações de amostras bacterianas e períodos de incubação	76
Gráfico 4 - Comparação do número de células entre as diferentes concentrações das amostras bacterianas em 72h de incubação	77
Gráfico 5 - Comparação entre o número de células A549 sobreviventes em diferentes concentrações de amostras bacterianas após 24, 48 e 72 horas de incubação	78
Gráfico 6 - Mapa perceptual via componentes principais para as variáveis	83
Quadro 1 - Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência	61
Quadro 2 – Iniciadores utilizados para a análise por ERIC-PCR das amostras de <i>A.baumannii</i> avaliadas	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões interpretativos da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de <i>Acinetobacter</i> spp.....	55
Tabela 2 - Resultado da Multiplex PCR para os genes <i>bla</i> _{OXA23} , <i>OXA24</i> , <i>OXA51</i> e <i>bla</i> _{OXA58} das amostras de <i>A. baumannii</i> avaliadas	66
Tabela 3 - Susceptibilidade a antimicrobianos de 62 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> , de acordo com seu perfil: sensíveis (S), com resistência intermediária (I) e com resistência plena (R).....	68
Tabela 4 - Frequência da combinação de genes carregados pelas amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> avaliadas	70
Tabela 5 – Frequência da associação entre <i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>ISAb</i> 1 e a expressão de resistência à carbapenêmicos.....	70
Tabela 6 - Frequência da associação entre <i>csuE</i> , <i>ompA</i> e a formação de biofilme em microplacas de poliestireno.....	72
Tabela 7 - Associação entre o perfil genotípico (<i>csuE</i> , <i>ompA</i> e <i>ISAb</i> 1), perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em microplacas de poliestireno de amostras clínicas de <i>A. baumannii</i>	73
Tabela 8- Matriz de correlação entre as variáveis analisadas.....	82
Tabela 9 - Valores-p obtidos pelo teste de associação linear.....	82
Tabela 10 – Perfil demográfico dos pacientes acompanhados no estudo.....	84
Tabela 11 – Perfil de gravidade dos pacientes acompanhados no estudo.....	85
Tabela 12 – Frequência das comorbidades apresentadas pelos pacientes avaliados no estudo.....	85
Tabela 13 – Perfil de internação em UTI dos pacientes acompanhados no estudo.....	86
Tabela 14 – Frequência de casos de doença infecciosa ou sepse por <i>A. baumannii</i> entre os pacientes acompanhados no estudo.....	86
Tabela 15 – Frequência dos genes de virulência e resistência pesquisados e expressão de metalobetalactamases em amostras de <i>A.baumannii</i> isoladas dos pacientes acompanhados no estudo.....	87
Tabela 16 – Associação entre a presença de genes de virulência de <i>A.baumannii</i> e o desfecho clínico (alta, transferências ou óbito) dos pacientes estudados.....	87

Tabela 17 – Tempo de internação total dos pacientes acompanhados no estudo.....	88
Tabela 18 – Análise da interferência da presença ou ausência de genes de virulência de <i>A.baumannii</i> no tempo médio de internação dos pacientes estudados.....	88
Tabela 19 – Associação entre a presença de genes de virulência de <i>A.baumannii</i> e a ocorrência de doença infecciosa nos pacientes estudados.....	89
Tabela 20 – Perfil genético das amostras analisadas por ERIC-PCR e tamanho das bandas relacionadas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB: Ampicilina-sulbactam
- ABC: *A. baumannii complex*
- AbOmpA: Proteína de membrana externa de *Acinetobacter baumannii*
- AHL: Lactona homosserina N-acil
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- Bap: Proteína associada á formação do biofilme
- BGN: Bastonetes Gram negativo
- Bp: Pares de bases
- BSAC: *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*
- CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
- CDL: *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase*
- CIM: Concentração inibitória mínima
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CN: Controle negativo
- COEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CP: Controle positivo
- CPS: Polissacarídeo capsular
- CRAb: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos
- CVC: Cateter venoso central
- DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Media*
- DNA: *Deoxyribonucleic acid*
- DO: Densidade óptica
- DOc: Densidade óptica do controle negativo
- DP: Desvio padrão
- DVP: Derivação ventrículo-peritoneal
- ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERIC: *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*

ESBL: Betalactamases de amplo espectro

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

Etest®: *Epsilometer test*

EUA: Estados Unidos da América

EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FBS: Soro fetal bovino

FDA: *Food and Drug Administration*

FSC: *Foward Scatter*

GM: Gentamicina

HC: Hospital das Clínicas

ICS: Infecção da corrente sanguínea

INICC: *International Infection Control Consortium*

IRAS: Infecção relacionada à assistência à saúde

ITUAS: Infecção do trato urinário associada à sonda vesical

LPS: Lipopolissacarídeo

MATE: Extrusão de compostos tóxicos e de multidroga

MβL: Metalobetalactamase

MCP: Morte celular programada

MDR: Multi-droga resistente

MFS: Super família facilitadora

MP: Meropenem

MPI: Meropenem associado à EDTA

MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT: 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5-difeniltetrazolium bromido

MYSTIC: *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program*

NA: Não aderente

NCBI: *National Center of Biotechnology Information*

NHSN: *National Healthcare Safety Network*

NNISS: *National Nosocomial Infection Surveillance System*

Omp: Proteína externa de membrana

OMV: vesículas de membrana externa

PAV: Pneumonia associada à ventilação mecânica

PBP: Proteínas ligadoras de penicilina
PBS: *Phosphate-buffered saline*
PCR: Reação em cadeia da polymerase
PDR: Pan-resistente a drogas
PO: Polimixina B
PTK: Proteína tirosina quinase
RND: Resistência-nodulação-divisão
SENTRY: *Antimicrobial Resistance Surveillance Program*
SMR: Baixa resistência a drogas
SOFA: *Sequential Organ Failure*
SSC: *Side Scatter*
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGC: Tigeciclina
TI: Tempo de internação
TNF α : Fator de necrose tumoral α
TSA: *Tryptic soy agar*
TZ: Ceftazidime
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
VIM: Verona imipenemase
XDR: Extensivamente resistente a drogas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
2.1.1 Aspectos taxonômicos e características gerais	23
2.1.2 Fatores de virulência	25
2.1.2.1 Cápsula	25
2.1.2.2 Fímbrias	26
2.1.2.3 Formação de biofilme	27
2.1.2.4 Indução de apoptose em células epiteliais	30
2.1.2.5 Vesículas.....	34
2.1.3 Resistência a antimicrobianos	35
2.1.3.1 Produção de betalactamases	38
2.1.3.2 Mudanças nos alvos dos antimicrobianos por mutação.....	42
2.1.3.3 Modificação (e proteção) do alvo.....	43
2.1.3.4 Falhas na permeabilidade.....	44
2.1.3.5 Sistemas de efluxo.....	45
2.1.3.6 Combinações de mecanismos de resistência.....	48
2.2 Importância epidemiológica de <i>A.baumannii</i> em instituições de assistência à saúde.....	49
3. OBJETIVOS	50
3.1. Objetivo geral	50
3.2. Objetivos específicos	50
4. METODOLOGIA	51
4.1 Etapa clínica	51
4.1.1 Desenho do estudo	51
4.1.2 População estudada	51
4.1.3 Critérios de inclusão	51
4.1.4 Critérios de exclusão	51
4.1.5 Variáveis estudadas	52

4.1.6 Período do estudo	52
4.1.7 Aspectos éticos da pesquisa	53
4.2 Etapa laboratorial	53
4.2.1 Amostras bacterianas	53
4.2.2 Confirmação molecular da identificação das amostras	53
4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)- <i>Epsilometer test</i> (Etest®)	54
4.2.4 Detecção fenotípica de enzimas relacionadas à resistência	56
4.2.4.1 Pesquisa de metalobetalactamases(MβL)	56
4.2.5 Detecções fenotípicas de fatores de virulência	56
4.2.5.1 Avaliação de morte celular induzida por <i>A.baumannii</i>	56
4.2.5.2 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno	58
4.2.6 Detecção genotípica de betalactamases	59
4.2.6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	59
4.2.7 Detecção genotípica de fatores de virulência	62
4.2.7.1 Detecção de genes associados à indução de apoptose em células epiteliais e formação de biofilme	62
4.2.8 Caracterização do perfil genético das amostras.....	62
4.2.8.1 Análise das sequências intergênicas repetitivas consenso enterobacterianas – ERIC.....	63
4.2.9 Controle de qualidade das reações.....	64
4.3 Pacientes.....	64
4.4 Análise estatística dos dados.....	65
5. RESULTADOS.....	66
5.1 Confirmação molecular da identificação das amostras.....	66
5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)- <i>Epsilometer test</i> (Etest®).....	67
5.3 Pesquisa fenotípica de metalobetalactamases(MβL)	68
5.4 Detecção genotípica de fatores de resistência e virulência.....	69
5.5 Detecção fenotípica de fatores de virulência.....	71
5.5.1 Formação de biofilme.....	71

5.5.2 Avaliação da indução de morte celular e apoptose.....	74
5.6 Correlação estatística entre as variáveis analisadas.....	81
5.7 Perfil clínico e demográfico dos pacientes participantes do estudo.....	84
5.8 Caracterização do perfil genético das amostras.....	89
6.DISSCUSSÃO.....	94
7.SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXOS.....	130
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	130
Anexo B - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética	131
Anexo C - Resultados da CIM aos antimicrobianos das 62 amostras de <i>A.baumannii</i> testadas pelo método Etest®.....	132
Anexo D – Descrição das variáveis analisadas na construção dos gráficos de contagem de células versus concentração do inóculo bacteriano.....	134
Anexo E – Perfil fenotípico e genotípico das 62 amostras clínicas de <i>A.baumannii</i> avaliadas no estudo.....	135

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Apesar de ter sido inicialmente considerado um micro-organismo com baixo potencial patogênico em indivíduos saudáveis, *Acinetobacter baumannii* é atualmente conhecido como um importante patógeno associado à doenças infecciosas nosocomiais. *A. baumannii* pode sobreviver em superfícies úmidas e secas e pode estar presente na pele saudável (ABBOTT *et al.*, 2013).

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

A gravidade das doenças associadas e a emergência de multirresistência aos antibacterianos por *A. baumannii* determinaram sua inclusão em um grupo de micro-organismos distinguidos por uma designação peculiar pela *Infectious Diseases Society of America* como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*), pela grande preocupação que suscitam quanto aos cuidados relativos à saúde.

Abbott e Peleg (2014) relatam que uma grande variação de incidência de *A.baumannii* tem sido observada em diversos países. De acordo com estes autores, em 2013, somente 02 países não notificaram casos de *A.baumannii* resistente a carbapenêmicos - CRAb (Islândia e Montenegro) e 06 países (Croácia, Grécia, Israel, Itália, Latvia e Lituânia) notificaram uma situação endêmica, com amostras de CRAb regularmente isoladas de pacientes na maioria de seus hospitais. Já os programas de vigilância nos Estados Unidos demonstram que a incidência de CRAb aumentou cerca de 08 vezes, variando de 5,2% em 1999 para 40,8% em 2010. Dados similares foram obtidos do continente asiático, onde 42,3% das amostras bacterianas isoladas foram resistentes a carbapenêmicos (*The Center for Disease Dynamics Economics & Policy website*).

Segundo Gandham (2014), a incidência de pneumonias graves causadas por *A. baumannii* multirresistentes em diversos países apresentou mortalidade associada de 30-75%. Além disso, o tempo de internação em UTI para tais pacientes aumentou em 07 dias.

Marra *et al.* (2011) apresentaram *A. baumannii* como agente de 11,4% das infecções monomicrobianas da corrente sanguínea relatadas em 16 hospitais brasileiros, sendo que 55,9% das amostras eram resistentes ao imipenem. Martins *et al.* (2014), ao avaliar o perfil de resistência de *A. baumannii* a antimicrobianos em cinco hospitais de Belo Horizonte, identificaram altas taxas de resistência ao imipenem (93,75%) e à polimixina B (39,06%). Ainda em Minas Gerais, um total de 73 pacientes com 84 amostras de *A. baumannii* foram obtidas entre 2009 e 2010. Destas, 59% eram multirresistentes, 11% pan-resistentes e 30% eram sensíveis à maioria dos antibacterianos (ANTÔNIO *et al.*, 2011).

Em estudo de Neves (2012), que caracterizou pacientes colonizados ou com doença infecciosa por *A. baumannii* internados na UTI de um hospital universitário de Belo Horizonte, 33 pacientes (59,9%) evoluíram para o óbito durante a permanência hospitalar, sendo que 29 (51,8%) durante a internação na UTI. Por fim, a mortalidade hospitalar observada foi de 59,9%, com valor mediano do escore de APACHE II igual a 15.

Assim, a identificação de marcadores de virulência e o conhecimento de como estes se manifestam poderão somar apoio ao corpo clínico na análise da associação destes fatores com a colonização e evolução para doença infecciosa nos paciente. Os resultados da epidemiologia molecular da resistência, além de gerar dados úteis para o tratamento dos pacientes, deverão contribuir com os programas de controle de infecção hospitalar no delineamento de novas estratégias de tratamento e do controle de disseminação destas linhagens multirresistentes a drogas, uma vez que os dados que refletem nossa realidade são escassos na literatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Acinetobacter baumannii*

2.1.1 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, comumente encontrado em ambientes de cuidado à saúde (ABBOTT *et al.*, 2013; POGUE *et al.*, 2013). As colônias do complexo *A.calcoaceticus-A.baumannii* se assemelham àquelas das enterobactérias, com 1,5 a 3 mm de diâmetro após uma cultura *overnight*, enquanto a maioria das outras espécies de *Acinetobacter* produz colônias menores e mais translúcidas (PELEG *et al.*, 2008).

Originalmente pertencente à família Moraxellaceae, o gênero *Acinetobacter* contém ao menos 21 espécies nomeadas, das quais *A. baumannii* é a mais importante em infecções humanas. *A.baumannii* é parte do complexo *Acinetobacter calcoaceticus – A.baumannii*, que inclui *A.calcoaceticus* (espécies genômicas 1; espécies predominantemente ambientais com limitada relevância clínica), *A.baumannii* (espécies genômicas 2), *Acinetobacter pittii* (espécies genômicas 3) e *Acinetobacter nosocomialis* (espécies genômicas 13TU), as quais são geneticamente muito semelhantes e dificilmente distintas fenotipicamente (NEMEC *et al.*, 2011). De acordo com Chuang *et al.* (2011), *A.baumannii* tem sido associado com grande resistência aos antibacterianos e alta mortalidade dos pacientes acometidos por suas doenças infecciosas quando comparado às outras espécies genômicas.

Na prática clínica, *A.baumannii* pode ser difícil de “descorar” durante a coloração de Gram e pode ser falsamente reportado como coco Gram positivo. *A.baumannii* consegue crescer em ágar simples e não seletivo. Quando em ágar sangue de carneiro apresenta-se em colônias opacas (ou brancas), mucóides, não hemolíticas e menores que as enterobactérias. Em ágar MacConkey apresenta-se como não-fermentador de lactose (ABBOTT *et al.*, 2013).

A maioria dos sistemas automatizados desempenham baixa performance ao fazer a diferenciação entre as espécies de *Acinetobacter*. De acordo com Abbott *et al.* (2013) os sistemas Vitek®2 API20NE (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) e Phoenix (Becton Dickinson, NJ, USA) tem baixa sensibilidade na identificação do complexo

A.baumannii-*A.calcoaceticus*, acarretando na identificação errônea de *A.pittii* e *A.nosocomialis* como *A.baumannii*. Espécies que têm sido associadas a doenças infecciosas incluem *A.lwoffii*, *A.junii* e *A. haemolyticus* e algumas espécies foram identificadas somente como colonizantes de pele humana ou mais raramente descritas como agente de doenças, tais como *A.johnsonii* e *A.radioresistens* (PELEG *et al.*, 2012). Dado que *A.baumannii* é associado com alta mortalidade e grande resistência aos antibacterianos, a diferenciação entre as espécies é fundamental para antibioticoterapia racional e adequada.

A. baumannii tem sido isolado de vários ambientes, como de solo contaminado com hidrocarbonetos em países que apresentam diferentes condições climáticas, como Índia (SARMA *et al.*, 2004) e França (BORDENAVE *et al.*, 2007). Diversas amostras de *Acinetobacter*, incluindo *A.baumannii*, são capazes de degradar combustíveis à base de diesel (MARA *et al.*, 2012). Dentre 66 amostras de solo analisadas em Hong Kong, mais de um terço continha *Acinetobacter* sp, com *A.baumannii* representando 23% destas bactérias (HOUANG *et al.*, 2001). *A.baumannii* também foi isolado de vegetais coletados em supermercados, feiras livres e hortas privadas (BERLAU *et al.*, 1999). Estudo conduzido na Coreia do Sul por Choi *et al.* (2012) alertou para a presença de *A.baumannii* em superfícies inanimadas que estão frequentemente em contato com humanos, como mesas em parques e console de jogos. *A.baumannii* também foi identificado em lama em criadouro de suínos no Reino Unido (BYRNE-BAILEY *et al.*, 2009) e em aquicultura (fazendas de peixes e camarões) no Sudeste Asiático (HUYS *et al.*, 2007). Ressalta-se que em todos os estudos citados, técnicas moleculares de identificação foram utilizadas.

Em relação à colonização por *A.baumannii* na comunidade, os dados são escassos. Um estudo realizado em Nova York por Zeana *et al.* (2003) demonstrou que 10,4% dos indivíduos saudáveis avaliados carregavam *A.baumannii* em suas mãos. Um estudo de prevalência conduzido com 102 soldados em treinamento nos Estados Unidos mostrou que 17% carregavam *A.baumannii* em sua pele (GRIFFITH *et al.*, 2006).

De Breij *et al.* (2012) caracterizaram a aderência de *A. baumannii* ATCC 19606 e *Acinetobacter junii* RUH2228 à pele e a formação de biofilme na pele através de uma modelo tecidual tridimensional (3D). Os resultados revelaram que ambas as cepas replicaram no estrato córneo por mais de 72 horas, mas não invadiram a epiderme.

A.baumannii, ao contrário de *A.junii*, formou grandes biofilmes no estrato córneo. A colonização bacteriana não afetou a ativação de queratinócitos, proliferação ou diferenciação ou induziu uma forte resposta inflamatória.

2.1.2 Fatores de virulência

2.1.2.1 Cápsula

Análises bioquímicas e bioinformáticas prévias sugerem que *A. baumannii* não produz lipopolissacarídeos (LPS), mas sim lipooligossacarídeos (LOS). Em LOS é ausente a unidade de repetição de antígeno-O, ligado ao cerne oligossacarídeo, devido à falta do gene *waaL*, o qual permeia a ligação do antígeno-O (KENYON *et al.*, 2013). Wright *et al.* (2014) identificaram que o domínio WaaL está associado tanto a genes que codificam as ligases do antígeno-O quanto com os genes *pglL*, envolvidos na glicosilação da proteína ligada ao antígeno-O. Porém a definição da função do gene contido neste domínio, somente com base no seu sequenciamento ainda não foi descrita.

Polissacarídeos de superfície, como a cápsula, são reconhecidos há muito tempo como importantes fatores de virulência em bastonetes Gram negativos. No entanto, o conhecimento do papel do polissacarídeo capsular na patogênese da infecção por *A. baumannii* ainda é incipiente (RUSSO *et al.*, 2010). Estudos em camundongos levaram à identificação de dois genes que são requeridos para a polimerização e montagem da cápsula. O primeiro, *ptk*, codifica uma proteína tirosina quinase (PTK) e, o segundo, *epsA*, codifica um polissacarídeo putativo que exporta uma proteína externa de membrana (EpsA) (CUTHBERTSON *et al.*, 2009). Russo *et al.* (2010) consideraram que estes genes são requeridos para um fenótipo positivo para cápsula e descreveram um papel essencial da cápsula na patogênese da infecção por *A. baumannii*, demonstrando que a cápsula K1 de AB307-0294 é uma importante protectina. Esse dado sugere que proteínas conservadas, as quais contribuem para um fenótipo capsulado, são potenciais alvos para drogas.

Kenyon *et al.* (2014) determinaram a estrutura da cápsula K2 de um clone de *A. baumannii* resistente a antibacterianos (GC2). Neste estudo demonstrou-se que o oligossacarídeo contém três açúcares simples, D-glucopiranosose (D-Glcp), D-galatopiranosose (D-Galp) e *N*-acetyl-D-galactosamina (D-GlcpNAc), e o açúcar complexo, ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-L-glycero-L-manno-non-2-

ulosônico (Pse5Ac7Ac ou ácido pseudamínico), primeiramente descrito em *A.baumannii* no referido estudo.

Segundo Kinsella *et al.* (2015), a biossíntese de glicoproteínas ligadas ao antígeno O é requerida para a glicosilação de proteínas e produção do polissacarídeo capsular em *A. baumannii* e está diretamente envolvido na patogenicidade deste micro-organismo. Para tais autores, o desenvolvimento de drogas antimicrobianas cujo alvo seja a biossíntese de glicoproteínas ligadas ao antígeno O poderá produzir novas opções terapêuticas para doenças infecciosas por *A. baumannii* e o desenvolvimento de uma vacina glicoconjugada contra este micro-organismo.

2.1.2.2 Fímbrias

A.baumannii é capaz de formar estruturas de superfícies, como *pili* (DE BREIJ *et al.*, 2009). Em *A. baumannii* ATCC 19606, crescido em ágar, dois tipos de *pili* foram descritos: o *pilus* curto (5-140 nm) (LEE *et al.*, 2006) e o *pilus* longo (140 -1000nm) (DE BREIJ *et al.*, 2009). O *pili* de *A.baumannii* desempenha importante papel na adesão à superfícies inertes ou vivas e na formação do biofilme bacteriano (HOMENTA *et al.*, 2014).

Uma das mais comuns estruturas protéicas que ornamentam a superfície externa de patógenos é o *pili* Tipo I, o qual desempenha importante papel na aderência de Gram negativos. Quatro clusters de genes que codificam este *pili* foram identificados em *A.baumannii*, os quais incluem o cluster *csu*. Os clusters dos genes ortólogos aos genes fimbriais (A1S_1507_1510) são bem conservados dentre as sete linhagens virulentas de *A.baumannii* investigadas no estudo de Eijkelkamp *et al.* (2014). Interessantemente, este cluster parece ser *downregulated* na cepa ATCC 17978 sob condições limitantes de ferro. Estudo de Rumbo-Feal *et al.* (2013) ao examinar a expressão de genes em biofilme versus células planctônicas em linhagens ATCC 17978 demonstrou que A1S_1507 é altamente *upregulated* em células em biofilme quando comparados às células planctônicas como aquelas dos genes *csu*. Além disso, o *pili* do tipo I parece desempenhar algum papel na aderência e formação de biofilmes de *A.baumannii*. Porém, a exata contribuição destes três clusters em diferentes condições requer análises mais detalhadas (EIJKELKAMP *et al.*, 2014).

Em estudo de Marti *et al.* (2011), o crescimento apresentado em película mostrou diferentes proteínas associadas à formação dos *pili*: duas chaperonas associadas ao sistema de formação de *pili* e um *pilus* putativo do tipo III. Tomaras *et al.* (2003) caracterizaram o operon *csu*, uma *chaperona-usher* organizadora da formação dos *pili* que tem sido associada à formação de biofilme em superfícies abióticas. Marti *et al.* (2011) demonstraram que este tipo de *pili* também está presente em películas formadas por *A. baumannii*; além das proteínas chaperonas CsuC, a proteína de membrana externa CsuD foi, também, identificada.

De acordo com Tomaras *et al.* (2003) a formação de biofilme em interfaces sólido-líquido tem sido associada, quase sempre, ao *pilus* *csu*. No entanto, Marti *et al.* (2011) descreveram que, na película formada por *A. baumannii* em interface ar-líquido, diferentes tipos de *pili* são requeridos, não somente para promover a adesão bacteriana, mas, também, para manter toda a estrutura suspensa na superfície do meio líquido. Esta múltipla expressão de diferentes sistemas de formação de *pili* requeridos para a adesão bacteriana pode também contribuir para a persistência particular de *A. baumannii* em instituições de cuidados à saúde (MARTI *et al.*, 2011).

Segundo Harding *et al.* (2013), *A. baumannii* produz *pili* tipo IV funcional, e utiliza-o tanto para transformação natural como para motilidade ocasional. Diversos pesquisadores hipotetizaram que *pili* tipo IV poderiam ser responsáveis, em parte, pelo motilidade independente de flagelo em superfícies, exibida por vários isolados clínicos de *A. baumannii*. Harding *et al.* (2013) demonstraram ainda que a motilidade em superfícies não foi dependente dos produtos dos genes *pilA*, *pilD*, *pilT*, e por correlação, pelo *pili* tipo IV, uma vez que é produto da codificação desses genes.

2.1.2.3 Formação de biofilme

Cabral *et al.* (2011) definem biofilmes como coleções de micro-organismos caracterizados por células irreversivelmente aderidas a um substrato e embedidas por uma matriz de substâncias poliméricas extra-celulares, como os exopolissacarídeos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias. De acordo com estes autores, a formação de biofilme é frequente em amostras clínicas de *A. baumannii* e é um requerimento importante para a colonização crônica de tecidos humanos e persistência em implantes médicos.

As células de *A.baumannii* quando em biofilme, comparadas com células planctônicas, mostraram uma maior organização no metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, motilidade, transporte ativo, metilação de DNA, aquisição de ferro, regulação transcricional e *quorum sensing*. 1621 genes são super expressados em biofilmes, incluindo 55 genes que são exclusivamente expressos por *A.baumannii* sésseis (RUMBO-FEAL *et al.*, 2013).

Os determinantes de virulência de *A.baumannii* incluem CsuA/BABCDE chaperona envolvida na formação de biofilme, regulada por um sistema de dois componentes (BfmS/BfmR) (TOMARAS *et al.*, 2003; TOMARAS *et al.*, 2008; DEBREIJ *et al.*, 2009), a proteína de membrana externa OmpA (CHOI *et al.*, 2005), outra proteína de membrana externa de 854 kDa, com alta similaridade a proteína associada à formação de biofilme (Bap)(LOHEFEM *et al.*, 2008), os auto-indutores de sintase AbaI, parte do sistema *quorum sensing* (NIU *et al.*, 2008) e o operon *pgaABCD* responsável pela produção de poly- β -1,6-Nacetilglucosamina (PNAG) (CHOI *et al.*, 2009).

O processo de formação de biofilme em diversas bactérias é mediado por vias de *quorum-sensing*. Segundo Chow *et al.* (2014), em *A.baumannii* o biofilme é formado através da ativação de uma rede de *quorum-sensing* LuxI/LuxR que envolve uma *abaI* sintase e um receptor *aba*. Apesar de várias formas de lactonas N-acil-homoserina (AHLs) terem sido encontradas em várias espécies de *Acinetobacter spp.*, estudo de Bhargava *et al.* (2010) demonstrou que a lactona 3-hidroxi-dodecanoil-L-homoserina (3-OH-C₁₂-HSL) é a principal molécula sinalizadora no *quorum-sensing* produzida por *A.baumannii*. Neste sentido, o uso de análogos de AHL para inibir as vias de *quorum-sensing* tem provado ser uma estratégia válida para a atenuação da formação de biofilme por este micro-organismo. Esta estratégia de anti-virulência é terapêuticamente atrativa desde que utiliza como alvo a virulência da bactéria e minimiza o risco de seleção de cepas resistentes (CHOW *et al.*, 2014).

De acordo com Tomaras *et al.* (2003) a inativação do *csuE*, que codifica uma adesina terminal, resulta na abolição da produção de *pili* e da formação de biofilme. Esta observação sugere que o operon *csuE/BABCDE*, que medeia a formação dos *pili*, desempenha papel crucial no início da formação do biofilme, por permitir a adesão de células bacterianas e iniciar a formação de microcolônias que precedem o completo

desenvolvimento das estruturas do biofilme. A expressão deste operon é regulada por um sistema de dois componentes, composto por uma quinase codificada por *bfmS* e uma resposta regulatória codificada por *bfmR*.

É interessante observar que a função deste sistema regulatório não é restrita à iniciação do biofilme, mas, também, na morfologia celular. De igual interesse é o fato de que a composição do meio de cultura e a interação das células com as superfícies abióticas desempenham um papel significativo quando o sistema BfmRS não é expresso (TOMARAS *et al.*, 2008). Juntas, estas observações alicerçam a importância dos sinais extracelulares não somente na iniciação e desenvolvimento do biofilme, mas, também, na morfologia das células que irão interagir com superfícies abióticas.

Gaddy *et al.* (2009) demonstram que *A.baumannii* 19606 se adere e forma biofilme em células epiteliais alveolares humanas e em filamentos de *Candida albicans*, mas não em células leveduriformes. De acordo com os autores, este processo não requer a expressão do operon *CsuA/BABCDE*, já que um derivado isogênico com um rompimento na região codificadora do *csuE* mostrou o mesmo fenótipo de biofilme da espécie parental. Tal fato se contrasta com observações descritas previamente, pelas quais a expressão deste gene e a subsequente montagem dos *pili* são passos essenciais para a formação do biofilme em poliestireno. Igualmente contrastante é a observação de que o mutante *csuE* de *A.baumannii* é capaz de aderir às células epiteliais do trato respiratório humano (DE BREIJ *et al.*, 2009; LONGO *et al.*, 2014).

Dados disponíveis na literatura mostram que a proteína de membrana externa *ompA*, uma porina trimérica de 38kDa atua como um poro de difusão de 1,3nm, que desempenha papel de adesão de *A.baumannii* em plásticos e também na interação do micro-organismo com células epiteliais humanas e filamentos de *Candida albicans* (CHOI *et al.*, 2008; GADDY *et al.*, 2009, LONGO *et al.*, 2014).

A adesina bacteriana Bap, expressa na superfície celular e conservada entre diferentes isolados clínicos, foi primeiramente demonstrada por Loehfelm *et al.* (2008) em *A.baumannii* sendo envolvida na adesão intracelular, garantindo a maturação do biofilme em diferentes substratos (LOEHFELM *et al.*, 2008; GOH *et al.*, 2013). Análises por microscopia eletrônica demonstraram que Bap é requerido para a estrutura tridimensional e para a formação de canais de água em superfícies como polipropileno, poliestireno e titânio (BROSSARD e CAMPAGNARI, 2012).

Nwugo *et al.* (2012) relataram que etanol pode afetar a formação de biofilme em superfícies abióticas. De fato, a produção de proteínas e o anabolismo de carboidratos parece aumentar na presença de etanol, aumentando assim o conteúdo de carboidratos do biofilme, e, conseqüentemente, a formação de biofilme e a diminuição da motilidade bacteriana.

A habilidade de *A.baumannii* crescer como biofilme em superfícies abióticas desempenha um importante papel em doenças infecciosas nosocomiais, devido à colonização de equipamentos hospitalares e artigos médicos, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais e tubos endotraqueais. (DONLAN, 2001; TRAUTNER e DAROUICHE, 2004; DJERIBI *et al.*, 2012; LONGO *et al.*, 2014).

2.1.2.4 Indução de apoptose em células epiteliais

Apoptose é um dos diversos tipos de morte celular programada (MCP) e é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, incluindo a condensação do núcleo (*pyknosis*) e fragmentação (*karyorrhexis*), assim como a formação de bolhas na membrana plasmática, a qual leva a formação de corpos apoptóticos (MARIÑO *et al.*, 2014). Apoptose é acompanhada por uma sequência de mudanças das características bioquímicas, incluindo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM), ativação de caspases efetoras como caspase 3, caspase 6 e caspase 7, e a ativação de hidrolases catabólicas que degradam a maioria das macromoléculas da célula, incluindo o DNA (FIGURA 1).

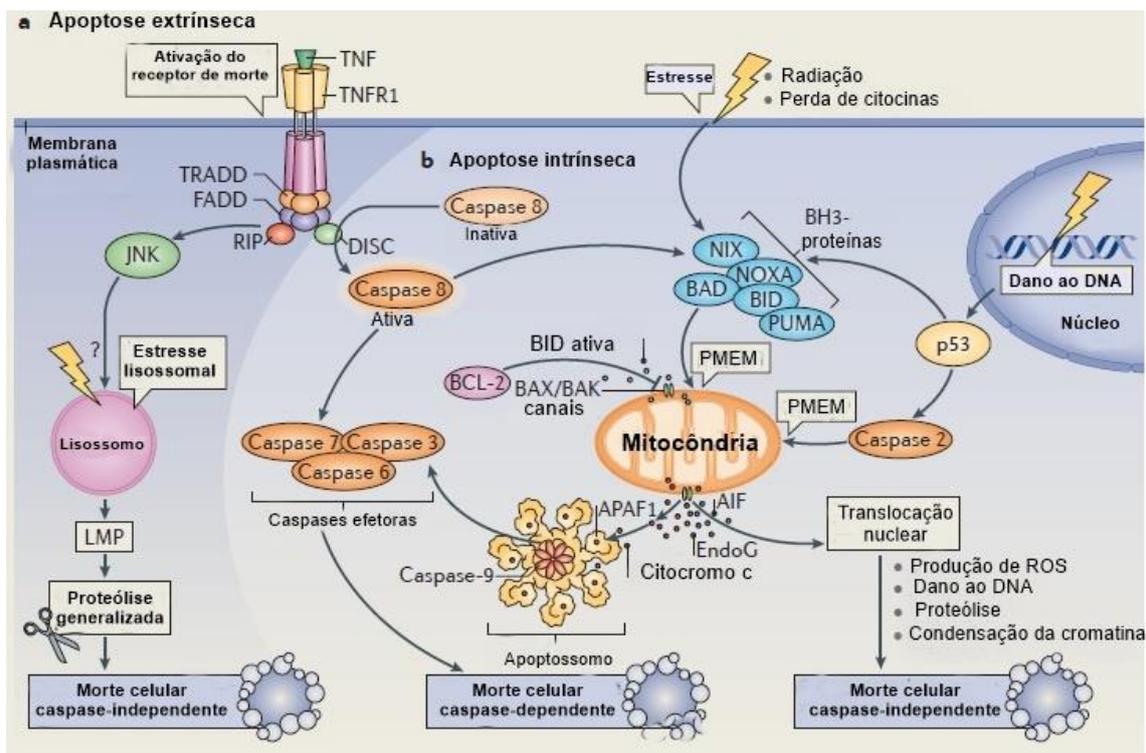
Uma importante alteração que ocorre durante o processo apoptótico é a externalização da fosfatidilserina. A fosfatidilserina, componente dos fosfolípidos da membrana celular no interior da membrana plasmática, redistribui-se e externaliza-se para fora da membrana nos estágios iniciais da apoptose. Para a detecção de fosfatidilserina na superfície das células, a anexina A5 pode ser utilizada como um ligante marcador. A anexina A5 (peso molecular de 35kD) é uma proteína endógena humana que consiste de 319 aminoácidos, pertencente à uma grande família de ligante de cálcio e fosfolípidos e pode ter um papel regulador endógeno em vários processos fisiopatológico. Tal molécula se liga fortemente e especificamente a resíduos de

fosfatidilserina. Há evidências de que anexina A5 está relacionada à citotoxicidade, mas sua função específica ainda precisa ser elucidada (ZHANG *et al.*, 2011; JEONG *et al.*, 2014).

O iodeto de propídeo (IP) é largamente utilizado em conjunto com anexina A5 para determinar se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas, através de diferenças apresentadas na integridade e permeabilidade da membrana celular. A habilidade de IP entrar na célula depende da permeabilidade da membrana; IP não penetra em células vivas ou nos estágios iniciais de apoptose devido à presença de membrana plasmática intacta. Nos estágios tardios da apoptose e em células necróticas, a integridade das membranas plasmática e nuclear diminui, permitindo ao IP alcançar os ácidos nucleicos e intercalar-se a eles, emitindo fluorescência (RIEGER *et al.*, 2011).

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

Figura 1 – Apoptose e outras modalidades de morte celular



Legenda: BAD, BCL-2: antagonistas de morte celular; DISC: complexo sinalizador indutor de morte; JNK: JUN-N quinase terminal; NIX: proteína X NIP3-like; ROS: espécies reativas de oxigênio.
 FONTE: Adaptado de MARIÑO *et al.*, 2014, p. 83.

Apoptose extrínseca

Ocorre em resposta à ligação dos chamados receptores de morte celular, os quais são CD95 (também conhecido como FAS), receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNFR1; veja na figura acima, parte **a**) ou o receptor de TNF relacionado ao ligante indutor de apoptose (TRAILR). Estes resultam no recrutamento de diversas proteínas, incluindo o domínio FAS associado à morte (FADD), domínio TNFR1 associado à morte (TRADD) e caspase 8. A caspase 8 ativada ativa proteoliticamente o efetor de caspases ou cliva a proteína BID da família BH3 (homóloga a BCL-2, agonista do domínio de morte celular), que co-ativa a via intrínseca da apoptose através da translocação para mitocôndria.

Apoptose intrínseca

Esta via é marcada por um evento central – permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) – que resulta na liberação do citocromo c do espaço intermembranoso mitocondrial (veja na FIGURA 1, parte **b**). O citocromo c citosólico desencadeia a montagem do complexo ativador de caspase entre a caspase 9 e fator de ativação de apoptose 1 (APAF1; o apoptossomo). PMEM pode ser desencadeado pela ativação das proteínas BH3, seguindo sua mobilização para os compartimentos subcelulares e sua modificação pós-traducional (como fosforilação ou proteólise) ou transcrição *upregulation* (em resposta à ativação de p53). As proteínas BH3 geralmente estimulam PMEM através da indução da oligomerização da proteína X associada a BCL-2 (BAX) e/ou antagonista BCL-2 ou *killer* (BAK) na membrana mitocondrial externa, formando, assim, canais supramoleculares que medeiam a liberação de proteínas solúveis do espaço intermembranoso. O dano ao DNA pode estimular a transativação de genes codificadores de proteínas pró-apoptóticas (como as proteínas BH3, moduladas positivamente (PUMA) e NOXA) por p53, ou ativa caspase 2 em uma via dependente de p53. Caspase 2 pode induzir PMEM e/ou ativar outras caspases como caspase 3, diretamente. Entre as proteínas mitocondriais que são liberadas como resultado de PMEM, o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G (EndoG) pode promover a morte celular independente de caspase, que também resulta de um estímulo que causa permeabilização da membrana lisossomal (LMP) para liberar proteases catépsinas no citosol. Catépsinas pode também desencadear PMEM, estimulando, desse modo, a via apoptótica intrínseca.

Necrose regulada

É frequentemente referida como “necroptose” e é um processo caspase-independente que envolve uma série de outras moléculas efetoras, incluindo a proteína de interação ao receptor 1 (RIP1) e as quinases RIP3 (veja na FIGURA 1, parte a)

Catástrofe mitótica

Consiste de um mecanismo onco-supressor que é iniciado através da interrupção do aparato mitótico durante a fase M do ciclo celular, a qual é precedida por algum grau de controle mitótico e eventualmente causa morte celular ou senescência.

Morte celular por autofagia

Outra modalidade de morte celular que, por definição, não envolve moléculas efetoras de apoptose ou necrose e ocorre durante a mitose.

Diversos patógenos bacterianos desenvolveram estratégias específicas para suprimir a resposta antimicrobiana efetiva de células não-fagocíticas a fim de evitar as defesas imunes inatas. A habilidade de patógenos bacterianos em promover a morte celular pode ser importante para a sobrevivência bacteriana, no escape das defesas do hospedeiro e é implicada no mecanismo de patogênese de uma variedade de doenças infecciosas (LIM *et al.*, 2005).

OmpA ou *omp38* é uma proteína de membrana externa envolvida no transporte de soluto; no entanto, é também associada a diversos aspectos de virulência em *A.baumannii*. *OmpA* pode ser secretada via vesículas de membrana externa (OMVs) e contribui para a biogênese de tais vesículas (JIN *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2012). A exposição a estas OMVs ou à *ompA* purificada induz morte da célula hospedeira por apoptose. A apoptose mediada por *ompA* é atribuída à sua localização e presumida atividade na mitocôndria ou atividade DNase no núcleo (CHOI *et al.*, 2005; 2008; LEE *et al.*, 2010), apesar de não terem sido descritos receptores de superfície ou alvos protéicos no núcleo ou na mitocôndria (GADDY *et al.*, 2009). *ompA* é também imunomodulatória. Apesar de nenhuma citocina pró-inflamatória ou secreção de quimiocinas ter sido observada em células expostas à *ompA*, células humanas da laringe, regularam positivamente a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) assim como a receptores toll-2 em resposta a *ompA* (KIM *et al.*, 2008). Os efeitos citotóxicos do estresse oxidativo também provêm outras conexões entre *ompA* e morte celular. Em concentrações subletais *ompA* ativa as células dendríticas através de receptores do tipo toll-2 e ambos ativam as vias de MAPK e NF-κB, que resultam na estimulação de células T CD4 através de resposta Th1 (LEE *et al.*, 2007).

Krzyminska *et al.* (2012) apresentaram evidências de que linhagens do complexo ABC induzem apoptose em células epiteliais, através de adesão às células e através de citotoxicidade mediada pelo contato. Além disso, para algumas linhagens, o contato da célula bacteriana com as células epiteliais e a invasão foram requeridos para a citotoxicidade e a morte celular por oncose. Os resultados deste estudo sugerem que a ativação de diferentes vias de morte celular em células epiteliais pode constituir um importante mecanismo de patogênese através do qual as linhagens evadem do sistema imune e causam doenças.

Smani *et al.*(2011) investigaram a natureza da morte celular induzida por *A. baumannii* através da coloração de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). O exame morfológico do núcleo celular corado com DAPI mostrou que células A549 expostas à linhagem de referência ATCC 19606 apresentaram típica morfologia apoptótica, com condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. O pré-tratamento com rifampicina reduziu significativamente a apoptose celular. Além disso, foi demonstrado que linhagens sensíveis a drogas induzem mais morte celular quando comparadas às multi ou pan-resistentes a drogas.

2.1.2.5 Vesículas

Uma grande variedade de espécies bacterianas Gram negativas mostra habilidade de secretar vesículas da membrana externa (OMVs) durante o crescimento bacteriano (JIN *et al.*, 2011). De acordo Kuehn *et al.* (2005), as OMVs são nanovesículas esféricas com um diâmetro médio de 20-200 nm e são compostas por LPS, proteínas, lipídeos e DNA ou RNA. Além disso, OMVs produzidas por bactérias Gram negativas patogênicas abrigam toxinas e fatores de virulência específicos, incluindo as toxinas termolábeis de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a toxina Shiga de *E.coli* O157:H7, a toxina citoletal de *Campylobacter jejuni* e a proteína Cif de *Pseudomonas aeruginosa* (JIN *et al.*, 2011).

Sobre a transferência de fatores de virulência às células hospedeiras, as OMVs desempenham uma importante função na patogênese bacteriana, sem a interação direta entre patógenos e células hospedeiras. Em estudos preliminares, Lee *et al.* (2001) determinaram que as moléculas bacterianas secretadas por *A. baumannii* eram diretamente responsáveis pela morte da célula do hospedeiro. Dentre a variedade de moléculas bacterianas, a proteína de membrana externa de *A. baumannii* (AbOmpA) foi

identificada como um potencial fator de virulência que induz a morte das células do hospedeiro através de alvos mitocondriais e nucleares (CHOI *et al.*, 2008). Entretanto, a secreção e transporte de AbOmpA às células hospedeiras permanecem obscuros. Kwon *et al.* (2009) demonstraram, ainda, que a amostra clínica de *A. baumannii* DU202 secretou OMVs no espaço extracelular, durante o crescimento *in vitro*. Além disso, diversos fatores de virulência foram identificados nas vesículas de *A. baumannii* DU202, sugerindo que teriam o papel de transportar fatores de virulência para a célula hospedeira. Em estudo de Jin *et al.* (2011), foram avaliados os diferentes efeitos das OMVs de *A. baumannii* nas células hospedeiras, particularmente a secreção de vesículas pela bactéria durante a infecção *in vivo*, o transporte de fatores de virulência às células hospedeiras e a subsequente toxicidade. As OMVs de *A. baumannii* representam um veículo para a transferência de moléculas bacterianas às células hospedeiras e, também, apresentam um potencial fator de virulência AbOmpA enriquecido nas vesículas, o qual contribui diretamente para a morte da célula hospedeira.

2.1.3 Resistência a antimicrobianos

Diferentes definições para bactérias multidroga-resistente (MDR), extensamente resistente a drogas (XDR) e panresistente a drogas (PDR) estão sendo usados na literatura médica para caracterizar os diferentes perfis de resistência encontrados nas bactérias resistentes a antibacterianos, identificadas em instituições de cuidados à saúde.

Em 2012, um grupo de profissionais se reuniu, baseados em uma iniciativa da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), para criar uma terminologia padrão internacional a fim de descrever os perfis de resistência em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (outras além de *Salmonella* e *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., todas bactérias frequentemente responsáveis por IRAS e com baixa sensibilidade aos antimicrobianos. Categorias de antimicrobianos epidemiologicamente importantes foram construídos para cada bactéria. Listas destas categorias propostas para testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram criadas utilizando os pontos de corte e documentos do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e do *United States Food and Drug Administration* (FDA).

MDR foi definido como não-susceptibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos; XDR foi definido como não-susceptibilidade a pelo menos um agente em todos de cada categoria, com exceção de duas ou menos categorias de antimicrobianos (ex: isolados bacterianos que permanecem susceptíveis a todos os agentes de uma ou duas categorias) e PDR foi definido como não-susceptibilidade a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

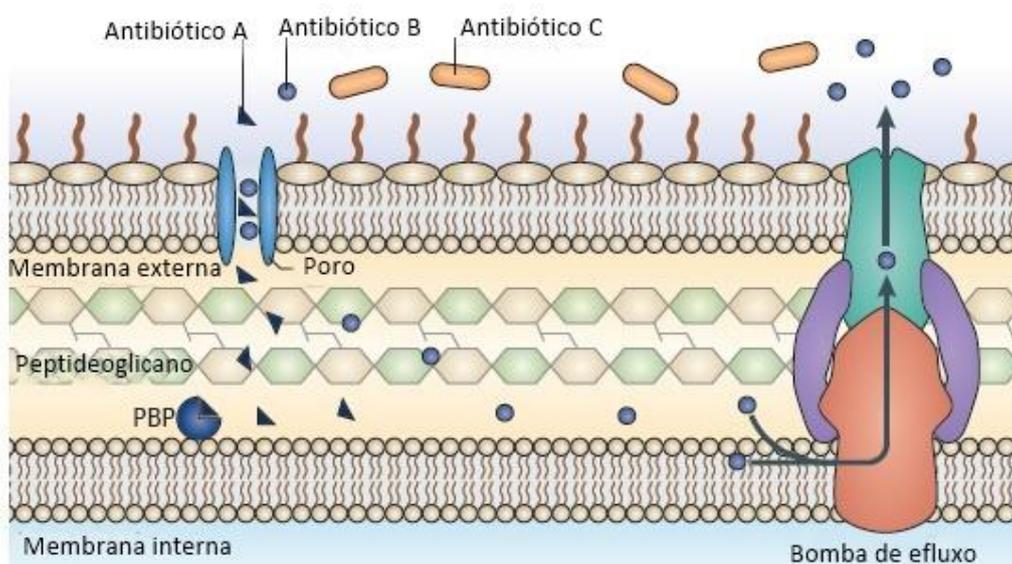
Uma das principais características que favore a sobrevivência prolongada de *A.baumannii* e sua disseminação em instituições de cuidados à saúde é sua habilidade de regular sua resistência intrínseca a antimicrobianos e adquirir mecanismos externos, de outros micro-organismos. Fournier *et al.* (2006) descreveram estas características quando sequenciaram e analisaram o genoma de *A.baumannii* na França. Eles reportaram uma ilha de resistência de 86kB denominada AbaR1. Esta ilha tem 88 janelas de leitura aberta, sendo 82 delas transferidas de outros micro-organismos, incluindo *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*. Infelizmente, mas não surpreendentemente, devido às ilhas de resistência, isolados MDR, têm se tornado relativamente comum. Análises epidemiológicas sobre resistência de *A.baumannii* nos Estados Unidos mostrou que os níveis de incidência aumentaram significativamente na última década, de 32,1% em 1999 para 51% em 2010 (THE SURVEILLANCE NETWORK USA, 2012).

Os mais recentes relatórios do Fórum Global de Riscos Econômicos Mundiais listou a resistência aos antimicrobianos como um dos maiores desafios para a saúde humana. É estimado que na Europa, 25.000 pessoas morrem a cada ano como resultado de doenças infecciosas causadas por micro-organismos MDR e acarreta em um custo para a União Europeia de mais de 1,5 bilhões de euros anualmente (BLAIR *et al.*, 2015). Entre 2000 e 2010, o consumo de antimicrobianos aumentou em 36%. Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul representam mais de 76% deste aumento (VAN BOECKEL *et al.*, 2014).

Espécies de *Acinetobacter* apresentam uma grande variedade de mecanismos de resistência enzimáticos e baseados em alterações na membrana plasmática, os quais podem ser regulados positivamente sob pressão seletiva. As classes de antimicrobianos que ainda apresentam alguma atividade, com variações, incluem algumas fluoroquinolonas (ex. ciprofloxacina), aminoglicosídeos (ex.gentamicina, tobramicina e

amicacina), carbapenêmicos (imipenem, doripenem e meropenem), polimixinas (polimixina B e colistina), tetraciclina (tigeciclina e minociclina), sulfametoxazol-trimetropim e sulbactam (disponível em combinação com ampicilina). Infelizmente, a resistência adquirida tem sido relatada para todos estes antimicrobianos, através de mecanismos enzimáticos de resistência mediados por plasmídeos (carbapenemases do tipo OXA, metalobetalactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e metilases ribossomais de rRNA 16S), alteração do alvo de ação de antimicrobianos (topoisomerasas, proteínas ribossomais e lipopolissacarídeos, o que confere resistência a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e colistina, respectivamente), perda de proteínas externas de membrana e regulação de bombas de efluxo que podem conferir resistência a betalactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tigeciclina (FIGURA 2) (ABBOTT e PELEG, 2014). A Figura 2 apresenta uma visão geral dos principais mecanismos de resistência intrínseca. O exemplo demonstra um antibiótico β -lactâmico que tem como alvo a proteína ligadora de penicilina (PBP). O antibiótico A pode entrar na célula via porinas na membrana, alcançar o alvo e inibir a síntese de peptideoglicano. O antibiótico B também poderá entrar na célula bacteriana via porina, mas ao contrário do antibiótico A, é eficientemente removido por efluxo. Antibiótico C não é capaz de cruzar a membrana externa e assim não tem acesso ao alvo.

Figura 2 - Mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos



Fonte: Adaptado de BLAIR *et al.*, 2015, p. 43.

A resistência aos antimicrobianos por *A.baumannii* tem aumentado progressivamente desde a década de 70, quando a maioria das cepas eram sensíveis aos

antimicrobianos utilizados. Até 2007, mais de 70% dos isolados eram MDR, incluindo a resistência a carbapenêmicos (ANTUNES *et al.*, 2014). A seguir serão apresentados os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos apresentados por *A.baumannii*.

2.1.3.1 Produção de betalactamases

A classificação mais utilizada para as betalactamases é a classificação de Ambler, que divide as betalactamases em quatro classes (A a D) com base em suas sequências de aminoácidos. As Classes A, C e D requerem serina em seu sítio ativo, enquanto as enzimas de Classe B requerem zinco, sendo então denominadas metalobetalactamases (JACOBS, 2011).

A presença de diversas betalactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases, incluindo as enzimas IMP (imipenemase), VIM (integron verona metalobetalactamase), carbapenemase *K.pneumoniae* (KPC), OXA (oxacilinase) e NDM em Gram negativos incluindo *A.baumannii* sustentam a emergência de isolados resistentes a todos os antimicrobianos β -lactâmicos, o que tem sérias implicações para o tratamento de doenças infecciosas graves, particularmente em hospitais (VOULGARI *et al.*, 2013; LYNCH *et al.*, 2013).

As betalactamases de amplo espectro (ESBL), pertencentes à Classe A de Ambler, conferem resistência às cefalosporinas, incluindo cefotaxima. Existem mecanismos específicos para a aquisição de uma variedade de ESBL em *A. baumannii*; porém, a prevalência destas enzimas não é bem conhecida devido às dificuldades na detecção laboratorial (PELEG *et al.*, 2008). Tal dificuldade é devida à presença de uma betalactamase de Classe C, a AmpC, que é codificada cromossomicamente. A expressão basal do gene *bla_{ampC}* não confere resistência às cefalosporinas; entretanto, a presença do elemento de inserção, *ISAbal1*, transponível, regula positivamente o gene *bla_{ampC}*, levando ao aumento da expressão do gene *ampC*, resultando na resistência a penicilinas e às cefalosporinas de 1^a a 3^a gerações (HERITIER *et al.*, 2006). O elemento de inserção *ISAbal1* contém sequências que estão associadas ao aumento da expressão de *bla_{ampC}*. A produção da enzima AmpC tem grande importância na resistência a cefalosporinas em *A. baumannii* devido ao fato de ser resistente ao inibidor de ácido clavulânico, enquanto as ESBLs não são. Além disso, as ESBLs são frequentemente adquiridas no ambiente e

bla_{ampC} ocorre intrinsecamente, admitindo-se que seja carregada ubiquamente em populações de *A. baumannii* (JACOBS, 2011).

Já as metalobetalactamases (MβLs) são betalactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam, aztreonam (MENDES *et al.*, 2006). Essas enzimas se caracterizam por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes (MURPHY *et al.*, 2003). Além disso, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (ácido 2-mercaptopropiônico), não sendo impedidas por inibidores de serino-betalactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (MENDES *et al.*, 2006). Tais enzimas conferem alto nível de resistência aos carbapenêmicos e a todos os outros betalactâmicos, com exceção do aztreonam, sendo usualmente encontradas em associação com o complexo classe 1 de integrons.

Segundo Mendes *et al.* (2006), as MβLs são produzidas intrinsecamente por determinadas bactérias, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas* spp. Contudo, desde o início da década de 90, novos genes que codificam MβLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (YAN *et al.*, 2001). Estes novos genes que codificam as MβLs foram encontrados inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, fazendo com que essas enzimas passassem a ser conhecidas como MβLs móveis ou MβLs adquiridas. De acordo com Young *et al.* (2012) e Vala *et al.* (2014), são conhecidas nove subclasses de MβL adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo-β-lactamase), GIM (German imipenemase), NDM (*New Delhi* metalo-β-lactamase) KHM-1 (*Kyorine Hospital* metalo-β-lactamase), AIM-1 (Australian imipenemase), DIM-1 (Dutch imipenemase) e SIM-1 (Seoul imipenemase), sendo esta última codificada pelo gene *bla_{SIM-1}*, detectado em sete amostras de *A. baumannii* isoladas em um hospital terciário, em Seul, Coréia, conforme descrito em estudo de Lee *et al.* (2005). As MβL adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídio bacteriano. No entanto, com exceção

da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo, as demais MBL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (MENDES *et al.*, 2004). Embora, ainda de acordo com Mendes *et al.* (2004), a grande maioria dos integrons encontrados em amostras clínicas pertença à classe 1, já foram descritas outras classes distintas de integrons (classes 2, 3 e 4). Membros dessas classes possuem suas respectivas integrases (intI1, intI2, intI3 e intI4), as quais compartilham similaridade entre 35% e 94% (COLLIS *et al.*, 2002). A classe 1 tem sido extensivamente estudada, e membros dela foram originalmente descritos como integrons. A classe 2 constitui-se de uma estrutura genética encontrada no transposon Tn7 e elementos relacionados; porém, essa classe é composta por uma integrase defeituosa e incapaz de promover a mobilização de cassetes gênicos. A classe 3 é composta por um único exemplo até hoje descrito (POIREL *et al.*, 2010).

De acordo com Bush e Jacoby (2010), oxacilinas são os mediadores de resistência mais comuns em *A.baumannii*. Oxacilinas são um grupo de β -lactamases que preferencialmente hidrolisam oxacilina em detrimento de benzilpenicilina. Além disso, podem efetivamente inativar as aminopenicilinas, meticilinas e em menor escala, algumas cefalosporinas de primeira geração.

Em alguns organismos, mutações pontuais nestas oxacilinas podem acarretar a hidrólise de cefalosporinas de espectro estendido, mas estas mutações não vistas com frequência em *A.baumannii*. Por outro lado, algumas cepas de *A.baumannii* apresentam um diferente conjunto de oxacilinas com atividade carbapenemase intrínseca; as CHDLs. Estas carbapenemases são o mecanismo mais comum pelo qual *A.baumannii* se torna resistente aos carbapenêmicos, apesar de serem relativamente ineficientes quando comparados a outros tipos de carbapenemases, como as metalobetalactamases (MBL) de classe B (POIREL *et al.*, 2006). Dentre as CHDLs existem cinco grupos principais:

- Grupo OXA23 (inclui OXA-23, OXA-27 e OXA-49)

Este subgrupo inclui OXA-23, OXA-27 e OXA-49, as quais diferem de OXA-23 pela substituição de dois aminoácidos. Essas enzimas são conhecidas pela disseminação através de transferência plasmidial. Sequências de inserção (*ISAbal*) tem sido descritas *upstream bla_{OXA23}*, sugerindo um papel na expressão destas CHDL (TURTON *et al.*, 2006; POGUE *et al.*, 2013).

- Grupo OXA58

Similar aos genes *bla*_{OXA23}, os genes *bla*_{OXA58} são adquiridos via plasmidial. Elementos de inserção (*ISAb*₁, *ISAb*₂, *ISAb*₃) também foram identificados upstream estes isolados, albergando *bla*_{OXA58}, sugerindo função similar na expressão desta enzima (NORDMANN *et al.*, 2002).

- Grupo OXA51/69

Como ampC, as variantes *OXA51/69* são cromossômicas e encontradas em todos os isolados de *A.baumannii*. Estas variantes são usualmente expressas em baixos níveis, o que resulta em baixo impacto na susceptibilidade a carbapenêmicos. Porém, se *ISAb*₁ está adjacente ao gene *bla*_{OXA51}, a hiperprodução deste gene pode ocorrer, levando à resistência a carbapenêmicos. No geral, a hiperprodução de carbapenemase pelas variantes *OXA51/69* parece ser um mecanismo pouco frequente de resistência a carbapenêmicos em *A.baumannii* (POGUE *et al.*, 2013)

- Grupo OXA24 (inclui OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40)

Genes relacionados ao grupo *bla*_{OXA24} têm uma característica distinta de *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA58}: são cromossomais e não plasmidiais (POIREL *et al.*, 2006).

- Outras β-lactamases

Embora seja um mecanismo de resistência a carbapenêmicos menos comum em *A.baumannii*, MBLs são muito mais eficientes e potentes hidrolizadores de carbapenêmicos. Historicamente, a atividade de imipenemase era a mais comumente encontrada dentre as MBLs em *A.baumannii*, apesar de terem sido identificadas Verona-imipenemase (VIM) e Seoul-imipenemase 1 (SIM-1) (POIREL e NORDMANN, 2006). Mais recentemente, Nova Deli metalobetalactamase (NDM) tem se tornado crescente mecanismo de resistência em *A.baumannii*. NDM produzida por *A.baumannii* foi inicialmente descrita em um paciente na Índia em 2010 (KARTHIKEYAN *et al.*, 2010). Desde então, tanto NDM-1 e NDM-2 têm sido identificadas em toda a Europa, assim como no Egito, China e Japão (POGUE *et al.*, 2013). Finalmente, um mecanismo não muito apresentado por *A.baumannii* resistentes a carbapenêmicos, mas já descrito e identificado são as carbapenemases de classe A de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). Um estudo de Robledo *et al.* (2010) realizado em Porto

Rico identificou dez isolados de *Acinetobacter* albergando bla_{KPC2} , bla_{KPC3} , bla_{KPC4} e bla_{KPC10} .

No Brasil, NDM-1 foi primeiramente identificado em *Enterobacter hormaechei* e *Providencia rettgeri* em 2013, por Carvalho-Assef *et al.* Em 2014, Pillonetto *et al.* descreveram o primeiro caso de *A.baumannii* produtor de NDM-1, isolado do trato urinário de um homem de 71 anos que foi a óbito devido a várias comorbidades, dentre elas doença infecciosa por *A.baumannii*. O gene NDM-1 foi detectado por PCR quantitativa e sua sequência confirmada em um plasmídeo ~100kb.

Novos determinantes da resistência a carbapenêmicos foram identificados e acredita-se que sejam transferíveis, ao menos entre linhagens de *A. baumannii*. OXA-143 é o primeiro representante de uma subclasse (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase* – CHDL), relacionada a enzimas OXA-40-like. A betalactamase OXA-143 hidroliza penicilinas e carbapenêmicos, mas não hidroliza, de modo significativo, cefalosporinas de espectro estendido, como observado em outras CHDLs. Neste sentido, é bem provável que OXA-143 contribua significativamente para a resistência ao imipenem e ao meropenem, como demonstrado previamente com OXA-23, OXA-40 e OXA-58 (GORDON *et al.*, 2010). Igualmente interessante é o fato de $bla_{OXA-143}$ não ter sido associado a sequências de elementos de inserção ou com características de integrons. Entretanto, foi agrupado por duas cópias no mesmo gene replicase, o que sugere um modo peculiar de aquisição genética, que pode corresponder a um processo de recombinação homólogo (GOULD, 2008).

Enquanto a expressão de determinantes de resistência intrínsecos ou adquiridos acarreta o aumento de resistência a diversos antimicrobianos, especificamente betalactamases, *A. baumannii* também codifica outros genes e modifica outras proteínas para ajudar em sua habilidade de sobreviver ao tratamento com estes fármacos.

2.1.3.2 Mudanças nos alvos dos antimicrobianos por mutação

A maioria dos antimicrobianos se liga a sítios específicos com alta afinidade, inibindo a atividade normal de seu alvo. Mudanças na estrutura do alvo que previnem de modo eficiente a ligação do antibacteriano, mas ainda permite que o alvo carregue suas funções normais podem conferir resistência. Durante o curso de uma infecção, há geralmente diversas populações de patógenos e se uma mutação pontual no gene

codificador do sítio do alvo do antimicrobiano puder oferecer resistência ao antimicrobiano, cepas com esta mutação poderão se proliferar (BLAIR *et al.*, 2015). Sun *et al.* (2014) investigaram a presença de mutações para os genes *gyrA* e *parC* que conferem resistência a fluoroquinolonas em *A.baumannii* ATCC19606 e em 34 amostras clínicas. Neste estudo, mutações no gene *gyrA* (Ser⁸³-Leu⁸³) ocorreram em 18 amostras resistentes (48,7%) e em *parC* (Ala⁷⁹-Asp⁷⁹ or (Ser⁸⁰-Leu⁸⁰) ocorreram em 08 amostras resistentes (21,6%) onde mutação em ambos os genes foi identificada em 02 amostras (5,4%) .

Bakour *et al.* (2013) avaliaram a susceptibilidade a antibióticos em 71 amostras clínicas de *A.baumannii*. Como resultado obtiveram altas taxas de resistência a fluoroquinolonas e cefalosporinas (>90%), sendo que mutações no sítio Ser83Leu em *gyrA* ocorreu em 94.4% das amostras e mutações em ambos Ser83Leu e Ser80Leu (or Ser84Leu) em *gyrA* e *parC* em 69.0% destas.

2.1.3.3 Modificação (e proteção) do alvo

A proteção através da modificação do alvo pode ser um efetivo modelo de resistência a antibacterianos que não requer uma mutação nos genes que codificam as moléculas alvo. Os antibacterianos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos são inibidores da síntese protéica que se ligam ao ribossomo bacteriano. Um mecanismo de resistência a aminoglicosídeos é a modificação do sítio ribossomal através da metilação (BLAIR *et al.*, 2015).

Segundo Wright (2005), a adição de grupos químicos a sítios vulneráveis na molécula do antibiótico por enzimas bacterianas causa resistência aos antimicrobianos por prevenir a ligação deste à proteína alvo, como resultado de bloqueio estérico. Diversos grupos químicos diferentes podem ser transferidos, incluindo os grupos acil, fosfato, nucleotidil e ribitol.

Os aminoglicosídeos são particularmente susceptíveis a modificação, uma vez que tendem a ser moléculas grandes com vários grupos hidroxil e amino expostos. As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos conferem altos graus de resistência aos antimicrobianos que modificam. Há três classes principais de enzimas modificadoras de antimicrobianos: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Estas classes são evolutivamente diversas e variam nos aminoglicosídeos que são capazes

de modificar (NORRIS e SERPERSU, 2013). No entanto, Romanowska *et al.* (2013) sugerem que todas as três classes são capazes de se ligar aos aminoglicosídeos já que seus sítios ativos mimetizam o sítio ativo do alvo para ligação ribossomal, inibindo a síntese protéica bacteriana.

As enzimas acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases têm sido encontradas em *A. baumannii*, ocorrendo com frequência em combinação. De acordo com Seward *et al.* (1998), podem estar localizadas em plasmídeos, transposons ou em associação com integrons de classe I. Em um estudo sobre a resistência a aminoglicosídeos em clones de *A. baumannii* na Europa (n=105), 95% das amostras isoladas encontradas continham ao menos um gene de resistência e 84% carregavam entre dois e cinco genes (NEMEC *et al.*, 2004). Tais autores identificaram um total de 12 diferentes combinações, com *aaC1*, *sadA1* e *sacA4* localizados em associação com integrons de classe I. A expressão destes genes acarreta variações na susceptibilidade a diferentes aminoglicosídeos. Outro grupo de enzimas foi descrito, as metiltransferases rRNA 16s (ArmA e RmtA, C, C e D), as quais conferem alta resistência a todos os aminoglicosídeos. Conquanto membros da família Rmt ainda não tenham sido encontrados em *A. baumannii*, o gene *armA* parece ser relativamente disseminado, geralmente em combinação com *bla_{OXA-23}* (CHO *et al.*, 2009).

2.1.3.4 Falhas na permeabilidade

Comparado com espécies Gram positivo, bactérias Gram negativo são intrinsecamente menos permeáveis a diversos antibacterianos já que sua membrana externa forma uma barreira de permeabilidade (VARGIU e NIKAIDO, 2012; KOJIMA e NIKAIDO, 2013). Porinas são proteínas capazes de formar canais, permitindo o transporte de moléculas através da bicamada lipídica da membrana, que apresenta baixa permeabilidade a solutos hidrofílicos. Estas desempenham múltiplas funções. As porinas podem agir como alvos potenciais para a adesão a outras células e ligação de compostos bactericidas à superfície de bactérias Gram negativas. Variações na sua estrutura como um mecanismo de escape da pressão dos antibacterianos ou regulação da expressão de porinas em resposta à presença de antimicrobianos são estratégias de sobrevivência que têm sido desenvolvidas por diversas bactérias (VILA *et al.*, 2007).

Antimicrobianos hidrofílicos atravessam a membrana externa através de difusão pelas porinas presentes. Dados recentes mostraram que em *Acinetobacter* spp. reduções

na expressão de porinas contribuem significativamente para a resistência a novas drogas como carbapenêmicos e cefalosporinas, geralmente mediada pela degradação enzimática (LAVIGNE *et al.*, 2013; POULOU *et al.*, 2013; BAROUD *et al.*, 2013).

Essas proteínas de membrana externa não somente influenciam a virulência de *A.baumannii*, mas também desempenham um papel significativo nos mecanismos de resistência. Por exemplo, a perda de uma proteína de membrana externa de 29kDa, mais tarde descrita como CarO, contribui para a resistência a imipenem (MUSSI *et al.*, 2007; CATEL-FERREIRA *et al.*, 2011).

Segundo Lin *et al.* (2014), diversos estudos identificaram um número de OMPs envolvidos na resistência a carbapenêmicos em *A.baumannii*. Neste sentido, Bou *et al.*, (2009) relataram que a redução na expressão de duas porinas de 22 e 33 kDa foi envolvida na resistência a carbapenêmicos em *A.baumannii* em um surto na Espanha.

Na presença de carbapenemases do tipo OXA-51 ou OXA-23, a perda de proteínas externas de membrana de 29 kDa foi associada com uma concentração inibitória mínima (CIM) elevada para imipenem em *A.baumannii* (FONSECA *et al.*, 2013). Além disso, uma sequência de inserção IS*Aba*10, inserida em IS*Aba*, adjacente ao gene OXA-23, pode interromper a proteína de membrana externa CarO em *A.baumannii* (LEE *et al.*, 2011). A perda de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa, resultante da diminuição da integridade de membrana, foi identificada em um isolado clínico de *A.baumannii* MDR na Austrália (MOFFATT *et al.*, 2010).

Bazyleu e Kumar (2014) avaliaram o impacto de várias condições ambientais na expressão de porinas e identificaram que houve *downregulation* de três porinas testadas em *A.baumannii* ATCC 19606, sendo considerado um importante fator para a modulação de resistência. Smani *et al.* (2014) mostraram que a interrupção do gene *ompA* levou à diminuição de CIMs para cloranfenicol, aztreonam e ácido nalidíxico em *A.baumannii*, caracterizando a contribuição de *ompA* para o fenótipo de resistência.

2.1.3.5 Sistemas de efluxo

Bombas de efluxo bacterianas transportam ativamente diversos antibióticos para fora da célula e são os principais contribuintes para a resistência intrínseca de Gram negativos a muitas drogas que podem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas por Gram positivos. Quando superexpressas, as bombas de efluxo podem

conferir altos níveis de resistência a antimicrobianos de grande valia na clínica. Algumas bombas de efluxo limitam a especificidade do substrato, como as bombas Tet, mas muitas transportam uma vasta gama de substratos estruturalmente diferentes e são conhecidas como bombas de resistência a múltiplas drogas (MDR) (BLAIR *et al.*, 2015).

De acordo com Jacobs (2011), os sistemas de efluxo a multidrogas tem sido agrupados em cinco famílias: a superfamília *ATP binding cassette* (ABC), a principal superfamília facilitadora (MFS), a família resistência-nodulação-divisão (RND), a família de extrusão de compostos tóxicos e de multidrogas (MATE) e a família de baixa resistência a multidrogas (SMR).

A superfamília RND é encontrada em Gram negativo e é a bomba de efluxo melhor descrita dentre as clinicamente relevantes. Quando superexpressas, as bombas do tipo RND conferem níveis clinicamente relevantes de MDR e exportam uma grande variedade de substratos (PIDDOCK, 2006). O conhecimento do mecanismo de superexpressão é importante já que é um mecanismo comum de resistência em isolados clínicos, e através do conhecimento aprofundado do mecanismo pode-se permitir a concepção de novas terapias para prevenir a expressão de bombas de efluxo. A transcrição dos genes que codificam as bombas de efluxo é controlada por reguladores locais, que são codificados adjacentes aos genes de bombas de efluxo, e por reguladores globais, que desempenham funções biológicas mais amplas (BLAIR *et al.*, 2015).

Mecanismos baseados em efluxo são responsáveis pela resistência a diferentes classes de antimicrobianos, incluindo tigeciclina ou imipenem em *A.baumannii* (RUZIN *et al.*, 2007). A importância das bombas de efluxo em *A.baumannii* MDR é validada pelo fato de que inibidores de bombas de efluxo como 1-(1-naftilmetil)-piperazina, phenil-arginina- β -naftilamida, or carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona, podem reverter o padrão de resistência (DENG *et al.*, 2014).

Quatro categorias de bombas de efluxo, incluindo superfamília resistência-nodulação-divisão (RND), superfamília facilitadora principal (MFS), família de extrusão de compostos tóxicos e de multidrogas (MATE) e família de transportadores de pequena multirresistência a drogas (SMR), tem sido relatadas como relacionadas à resistência a antimicrobianos em *A.baumannii* (WIECZOREK *et al.*, 2008; BLAIR *et al.*, 2015). Dentre estas diferentes bombas, a RND e MFS são mencionadas com maior

frequência. AdeABC, um tipo de bomba RND, com três componentes em sua estrutura é associada a resistência a aminoglicosídeos e com a redução de susceptibilidade a diversos antimicrobianos, incluindo tigeiclina (RUZIN *et al.*, 2007). Um número de bombas de efluxo do tipo MFS, incluindo TetA, CmlA, MdfA, CrA e AmvA, que medeia a resistência a diferentes tipos de antibióticos em *A.baumannii* tem sido caracterizados (LIN *et al.*, 2014). AbeM, uma bomba pertencente à família MATE foi identificada em isolados clínicos de *A.baumannii* em diversos estudos e confere resistência a fluoroquinolonas ou imipenem em *A.baumannii* (DENG *et al.*, 2014).

As bombas de efluxo do tipo ABC são dependentes de ATP e o utilizam como fonte de energia para expelir os antimicrobianos para fora da célula. Os membros desta família estão raramente envolvidos na aquisição de resistência a antimicrobianos em bactérias Gram negativo. Os outros tipos de bombas de efluxo são antiportadores próton-droga. A expulsão dos antimicrobianos é efetuada através da utilização da força próton motora (POOLE, 2002).

Ainda de acordo com Poole (2002), as principais bombas de efluxo envolvidas na multirresistência a drogas pertencem ao grupo de transportadores dependentes da força próton motora, sendo a família RND o grupo mais importante, seguida das famílias MFS e SMR. Em *A. baumannii*, a resistência mediada por bombas de efluxo é, geralmente, associada às famílias MFS e RND (VILA *et al.*, 2007). Através da aproximação genômica comparativa, Fournier *et al.*, (2006), recentemente se aventuraram na identificação de todos os genes de resistência da linhagem de *A. baumannii* AYE, multidrogaresistente, a qual é epidêmica na França. A maioria dos genes de resistência encontrados nesta linhagem foi adquirida de outras bactérias, tais como *Pseudomonas*, *Salmonella* ou *E.coli* e estes foram agrupados em uma região de 86 kb ou ilha. Esta ilha de resistência (*AbaR1*) contém 45 genes preditos a serem associados com resistência a drogas antimicrobianas, metais pesados e antissépticos; fora desta ilha, 46 fases de leitura aberta foram putativamente associadas com resistência a antimicrobianos, das quais 32 fases de leitura aberta foram associadas à família RND, sete com a família MFS, duas com a família MATE e uma com a família SMR. Além disso, um gene foi associado com a superfamília ABC e outro com a superfamília DMT. A remoção de drogas por mecanismos ativos de efluxo contribui, substancialmente, para a multirresistência a drogas (FOURNIER *et al.*, 2006).

Bombas de efluxo de estrito espectro da superfamília MFS incluem aquelas envolvidas na resistência à tetraciclina (*TetA* e *TetB*) e à monociclicina (*TetB*), assim como o sistema CmlA, o qual expulsa o cloranfenicol (HUYS *et al.*, 2005; FOURNIER *et al.*, 2006). Nem *TetA* nem *TetB* afetam a tigeciclina. As bombas do tipo RND são compostas por três bombas com ampla especificidade por substrato, consistindo em uma estrutura tripartite com componentes periplasmáticos, internos e externos. Dois sistemas foram caracterizados em *A. baumannii*, AdeABC e AdeIJK. A resistência a aminoglicosídeos, betalactâmicos, clorafenicol, eritromicina e tetraciclina ocorre devido à superexpressão de *adeABC*, um fenômeno sob controle de um sistema regulatório com dois componentes, codificado pelos genes *adeRS* (GORDON *et al.*, 2010). De acordo com Peleg *et al.*, (2007), mutações pontuais nos genes reguladores (*adeR*) e nos sensores quinase (*adeS*) podem acarretar a superexpressão de *adeABC*, mas o controle por outros reguladores transcricionais também parece ser importante, especialmente no efluxo de tigeciclina mediado por *adeABC*. A segunda bomba RND, *adeIJK*, tem especificidade de substrato, favorecendo compostos anfífilos e contribuindo sinergisticamente com *adeABC* para a resistência à tigeciclina (DAMIER-PIOLL *et al.*, 2008).

Uma bomba pertencente à família MATE, *AbeM*, também foi caracterizada. De acordo com Su *et al.* (2005), a superexpressão desta bomba resulta em reduzida sensibilidade a quinolonas, gentamicina, kanamicina, eritromicina, cloranfenicol e trimetoprim. O sistema de efluxo mais recentemente descrito, designado AbeS, pertence a uma pequena família de multirresistência bacteriana associada a proteínas de membrana (BIMP), a qual parece contribuir para a resistência a quinolonas, macrolídeos e cloranfenicol (SRINIVASAN *et al.*, 2009).

2.1.3.6 Combinações de mecanismos de resistência

Outros mecanismos de resistência incluem a regulação negativa das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), associadas à resistência a betalactâmicos, mutações na DNA girase e na topoisomerase IV (resistência à fluoroquinolonas), a proteína de proteção ribossomal de tetraciclina (*TetM*), uma dihidrofolate redutase putativa (*folA*) envolvida na resistência ao trimetoprim e mutações em um regulador de dois componentes (*pmrA/B*) associado com a resistência às polimixinas (GORDON *et al.*, 2010). A relativa contribuição de cada mecanismo para uma resistência completa parece ser variável entre as espécies, com algumas apresentando um maior impacto que as

outras. As amostras multidrogarresistentes podem possuir vários mecanismos que conferem resistência a uma mesma classe de antimicrobianos, somando-se à dificuldade de encontrar agentes terapêuticos adequados.

2.2 Importância epidemiológica de *A.baumannii* em instituições de assistência à saúde.

Espécies de *Acinetobacter* são cada vez mais crescentes em instituições de cuidados à saúde, tanto como patógenos endêmicos como ocasionais agentes de surtos. Porém, uma vez que *Acinetobacter* tenha se tornado endêmico se torna difícil erradicá-lo deste ambiente. Por esta razão, a identificação precoce, o controle rigoroso da disseminação e a prevenção do estabelecimento de cepas endêmicas são cruciais.

Estratégias para controle de surtos de *Acinetobacter* incluem a vigilância microbiológica ativa, vigilância microbiológica do ambiente, melhoria dos programas de higienização das mãos, limpeza e desinfecção do ambiente, isolamento de pacientes em quartos únicos, corte de funcionários, restrição de acesso à Unidade de Terapia Intensiva e uso racional de antimicrobianos (COOKSON *et al.*, 2006).

Contaminação de luvas, roupas e mãos de profissionais da saúde por *A.baumannii* MDR ocorre após o contato com um paciente fonte (MORGAN *et al.*, 2010). *Acinetobacter* é facilmente transmitido dos profissionais de saúde e do ambiente, incluindo equipamentos de assistência à saúde, aos pacientes. A habilidade de formar biofilme permite que *A.baumannii* sobreviva por semanas em superfícies abióticas, sob condições de dessecação (GAYOSO *et al.*, 2014). Apesar de alguns estudos, como o de Wilks *et al.* (2006) terem demonstrado controle eficiente de infecção sem isolamento dos pacientes com doença infecciosa ou colonizados, a implementação de precauções durante contato e o isolamento de pacientes é geralmente encorajada. O uso de equipamentos exclusivos para os pacientes pode facilitar o controle de surtos e a manutenção de um regime apropriado de higiene de mãos para os profissionais de saúde também é importante.

Como a exposição prévia a antimicrobianos é considerada um fator de risco para surtos e resistência bacteriana, a restrição do uso de antibióticos de largo espectro poderá contribuir para a redução de infecções.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, por parâmetros fenotípicos e genotípicos, a presença de fatores de virulência e resistência em amostras de *Acinetobacter baumannii* recuperadas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, e investigar a associação desses fatores com alguns desfechos clínicos.

3.2 Objetivos específicos

Das amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas dos pacientes incluídos no estudo:

- Confirmar a identificação das espécies através de métodos moleculares;
- Determinar a menor concentração de antimicrobianos específicos, de interesse clínico, capazes de inibi-las;
- Avaliar, por métodos fenotípicos, a expressão de metalobetalactamases;
- Analisar a presença de genes codificadores de oxacilinases (*bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{OXA143}), bem como do elemento de inserção *ISAbal1*;
- Analisar a presença de gene codificador de metalobetalactamase (*bla*_{VIM-1});
- Avaliar, por métodos fenotípicos a expressão de fatores de virulência associados à fímbrias, biofilme e apoptose em células epiteliais;
- Pesquisar a presença de genes associados à formação e produção de fímbrias, biofilme e apoptose em células epiteliais;
- Associar o perfil epidemiológico dos pacientes assim como a interferência dos fatores de virulência identificados no desfecho clínico (doença infecciosa, colonização ou óbito).
- Avaliar a associação entre os fatores de virulência pesquisados e alguns desfechos clínicos (doença infecciosa *versus* colonização, óbito *versus* sobrevivência).

4 METODOLOGIA

4.1 Etapa clínica

4.1.1 Desenho do estudo

Tratou-se de estudo observacional, em coorte prospectiva. A primeira parte do estudo foi conduzida no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), em Belo Horizonte, Brasil. O HC-UFMG é um hospital universitário que atende uma elevada parcela de pacientes de alta complexidade, e possui 506 leitos ativos, sendo 56 leitos de terapia intensiva adulto. A segunda parte compreendeu as análises microbiológicas, fenotípicas e moleculares, que foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e no Laboratório de Patologia das Leishmanioses, ambos do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

4.1.2 População estudada

Todos os pacientes adultos (idade ≥ 18 anos), internados no HC-UFMG no período de estudo (fevereiro de 2012 a maio de 2013), nos quais foram isoladas amostras de *Acintebacter baumannii* foram avaliados para potencial inclusão no estudo.

4.1.3 Critérios de inclusão

- Idade ≥ 18 anos;
- Isolamento de *A. baumannii* (em culturas clínicas e em *swabs* de vigilância);
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No caso de pacientes sem condições de assinar o TCLE (como exemplo, pacientes sedados), o mesmo poderá ser assinado por familiares ou responsáveis (ANEXO A).

4.1.4 Critérios de exclusão

- 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;
- Pacientes já colonizados por BGN não-fermentadores, provenientes de outras instituições.

4.1.5 Variáveis estudadas

Os seguintes dados foram coletados de todos os pacientes, à inclusão e durante o seguimento:

- Dados demográficos: idade, sexo;
- Comorbidades (listagem);
- *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) (se internado em UTI);
- Uso de antimicrobianos nos últimos 90 dias;
- Internação nos últimos 90 dias;
- Internação em CTI ou na Sala de Emergência nos últimos 90 dias;
- Procedimentos invasivos nos últimos 14 dias (broncoscopia, uretroscopia, colonoscopia, cirurgias de grande porte);
- Uso de dispositivos invasivos na internação atual (cateter vesical de demora, cateter venoso central, tubo orotraqueal, traqueostomia, outros);
- Tempo de internação antes da inclusão no estudo;
- Principal(ais) diagnóstico(s) à inclusão;
- Sítio(s) de isolamento do micro-organismo de interesse;
- Gravidade da doença infecciosa;
- Ocorrência de doença infecciosa pelo micro-organismo de interesse;
- Ocorrência de sepse;
- Classificação de sepse (caso ocorra);
- Avaliação pelo score internacional *Sequential Organ Failure* (SOFA) no dia de internação em UTI (caso ocorra);
- Duração da internação hospitalar;

Os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados por um estudante de pós-graduação (mestrado), o qual procedeu à coleta de informações até o dia da alta, óbito ou transferência para outro serviço de saúde.

4.1.6 Período do estudo

O período de estudo foi de dois anos, sendo um ano para obtenção de espécimes clínicos e identificação bioquímica/fisiológica e molecular; e determinação da concentração inibitória mínima e, no ano seguinte, foram realizadas as análises

fenotípicas e moleculares relativos à virulência e correlação com os quadros clínicos dos pacientes.

4.1.7 Aspectos éticos da pesquisa

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pelo médico responsável de acordo com a rotina do serviço. O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital participante e do COEP/UFMG com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE)– 01402312.60000.5149 (ANEXO B). No caso de pacientes sem condições de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (como exemplo, pacientes sedados), o mesmo foi assinado por familiares ou responsáveis.

4.2. Etapa laboratorial

4.2.1 Amostras bacterianas

Foram avaliadas neste estudo 62 amostras de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes a antimicrobianos recuperadas de sítios diversos de pacientes colonizados ou com doença infecciosa incluídos no estudo, no período de agosto de 2012 a maio de 2013.

As amostras bacterianas foram isoladas, identificadas e testadas quanto à sua susceptibilidade a antimicrobianos, no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte, utilizando-se Protocolos Operacionais Padrão da instituição participante. Até o início desta pesquisa, foram estocadas em *freezer* a – 80°C, no meio líquido *Broth Heart Infusion* (BHI-DIFCO®) acrescido de 15% de glicerol.

4.2.2 Confirmação molecular da identificação das amostras

Para a confirmação das espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foi realizada a detecção genotípica do gene *bla*_{OXA51}, sabidamente marcador da espécie, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, na qual se detectou ainda a presença de outras oxacilinas (*bla*_{OXA23, 24, 58}).

a) Extração do DNA bacteriano

Uma alíquota do crescimento bacteriano foi homogeneizada em 1mL de água estéril, até atingir a turvação correspondente ao valor de 0.5 da escala *McFarland*. Em seguida, esta suspensão foi levada por 10 minutos a 95°C, para extração de DNA, e centrifugada a 9000 rpm por 3 minutos (GALES *et al.*, 2003, HAMMAMI *et al.*, 2011, MARTINS *et al.*, 2014).

b) Preparo do Master-Mix

Foi utilizado o kit Master Mix (Promega[®], MADISON- WI USA) contendo: 500 units/ml de Taq DNA polimerase, 400µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de MgCl₂. Cada reação ocorreu com um volume final de 25 µL sendo 12,5 µl de Master Mix + 1,2 µL de *primers* F e R + 100 ng de DNA bacteriano extraído + água livre de nuclease, para completar o volume de 25 µl.

c) Condições de amplificação

As condições de amplificação foram feitas de acordo com WOODFORD *et al.* (2006), com algumas modificações:

- 94°C iniciais por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de;
- Desnaturação a 94°C, por 1 minuto,
- Anelamento a 52 °C, por 1 minuto,
- Extensão a 72°C, por 1 minuto,
- 72°C finais por 8 minutos.

Todas as amostras com perfil positivo para *bla*_{OXA51} foram utilizadas nas etapas subsequentes.

4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) -*Epsilon*meter test (Etest[®])

Para fins de padronização da metodologia de detecção da concentração inibitória mínima (CIM), e considerando as peculiaridades da Instituição envolvida no estudo, todas as amostras foram novamente submetidas aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pelos métodos de *Epsilon*meter test (E-test[®]) no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Foram testadas as seguintes drogas Ampicilina-

Sulbactam (AB), Ceftazidime (TZ), Gentamicina (GM), Meropenem (MP), Polimixina B (PO) e Tigeciclina (TGC).

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala *McFarland* e inoculada em uma placa de 15 cm contendo ágar Muller-Hinton (Bectondickinson®, FRANÇA). Em seguida, as fitas de *Etest*® foram acrescentadas às placas previamente inoculadas com a suspensão bacteriana e estas, incubadas a 35 °C, por 24 horas.

b) Interpretação

Após incubação, quando houve crescimento visível, o valor de CIM foi lido no ponto de interseção entre o halo e a fita de *Etest*. Quando houve crescimento ao longo da fita, por exemplo, e nenhuma inibição elíptica foi vista, a CIM foi reportada como “> que” o máximo valor da escala. Quando a inibição elíptica ocorreu abaixo da fita, por exemplo, a zona de inibição não interseccionou com a fita, a CIM foi reportada como o “<” valor que o mínimo valor da escala. 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), conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Padrões interpretativos da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de *Acinetobacter* spp.

<i>Acinetobacter</i> spp.			
Agentes antimicrobianos	Padrão de interpretação de resultados (halo em µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina/sulbactam ¹	≤4	8	≥ 16
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 2	4	≥ 8
Polimixina B	≤ 2	-	≥ 4
Tigeciclina ²	≤0,25	-	≥0,5

Legenda: ¹ Valores definidos por CLSI (2013) para *Enterobacteriaceae*

² Valores definidos por BSAC (2014).

FONTE: CLSI, 2013; CLSI, 2014; BSAC, 2014.

4.2.4 Detecção fenotípica de enzimas relacionadas à resistência

4.2.4.1 Pesquisa de metalobetalactamases (MβL)

a) Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado como já descrito para os demais antimicrobianos pelo método do Etest®. Em seguida, as fitas de Etest MβL MP/MPI (contendo meropenem (MP) em uma das extremidades, em um gradiente que varia de 4 a 256 µg/mL, e meropenem associado ao EDTA (MPI) na outra extremidade, num gradiente que varia de 1 a 64 µg/mL, foram acrescentados às placas previamente inoculadas com a suspensão bacteriana e estas, incubadas a 35 °C, por 24 horas.

b) Interpretação

Foram consideradas amostras produtoras de MβL quando a relação da CIM (µg/mL) entre MP/MPI for maior ou igual a oito, e quando houve uma diminuição de 3 diluições entre MP/MPI. O aparecimento de deformação da elipse (aparecimento de uma zona fantasma), também foi considerado como indicativo de produção de MβL e ESBL.

4.2.5 Detecções fenotípicas de fatores de virulência

4.2.5.1 Avaliação de morte celular induzida por *A.baumannii*

a) Cultura de célula humana

O ensaio para avaliação fenotípica de indução de apoptose em células epiteliais foi realizado segundo protocolo definido por Smani *et al.* (2011).

As linhagens celulares do pneumócito Tipo II A549 derivadas de carcinoma de pulmão foram gentilmente cedidas pelo Professor Remo de Castro Russo, do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As células foram crescidas no meio *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado pelo calor, penicilina (50 µg/ml), estreptomicina (20 µg/ml), glutamina(100 mmol/L) ; em estufa com 5% de CO₂ e à 37°C. As células A549 foram repicadas a cada 3-4 dias.

b) Cultura bacteriana para infecção

As amostras bacterianas foram descongeladas e incubadas em 5 ml de meio *Tryptic Soy Broth* (BHI-DIFCO®) por 24h. Posteriormente foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em meio DMEM sem antimicrobianos, suplementado com 10% de soro fetal bovino e glutamina (100 mmol/L). Procedeu-se então à sonicação das amostras em 05 ciclos de 01 minuto com intervalo de 1 minuto, na potência de 40 W. Para mensuração da densidade bacteriana utilizou-se o DensiCHEK® para alcance de 4,0 na escala McFarland ($1,2 \times 10^9$ UFC/ml). Em seguida foram realizadas diluições seriadas. Uma alíquota de 100 µl de cada diluição foi utilizada no experimento.

c) Cultura de células em lamínulas de vidro

Quatro amostras bacterianas foram selecionadas para a execução deste experimento, em duplicata: 01 amostra *ompA* negativo associada a colonização (amostra 04), 01 amostra *ompA* negativo associada a doença infecciosa (amostra 06), 01 amostra *ompA* positiva associada a colonização (amostra 14), 01 amostra *ompA* positivo associada a doença infecciosa (amostra 16). As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro, colocadas dentro de placas para cultura de células de 24 poços (diâmetro dos poços: 16mm), em meio essencial de Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2mM de glutamina, sem antimicrobianos, em uma estufa umidificada a 97%, a 37°C e com 5% de CO₂. As células foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço em 100 µl e após 1h de adesão, foram acrescidas as culturas bacterianas em concentrações decrescentes, de 1×10^8 a 1×10^1 . O experimento foi realizado em duplicata e o cultivo celular sem inóculo de bactérias foi utilizado como controle negativo. As lamínulas eram removidas para observação a cada 24, 48 e 72h. Após o período de incubação as lamínulas foram coradas com panótico e fixadas em lâminas de microscopia para avaliação em microscopia de captura.

d) Contagem celular

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

e) Ensaio de avaliação de apoptose em células A549

Para o ensaio de apoptose, utilizou-se o kit Alexa Fluor® 488 annexin/Dead Cell Apoptosis da Invitrogen para citometria de fluxo, segundo protocolo recomendado.

Foi preparado um controle negativo através da incubação das células sem o agente indutor (amostras de *A.baumannii*) e testadas 04 amostras em duplicata: 01 amostra *ompA* negativo associada a colonização (amostra 04), 01 amostra *ompA* negativo associada a doença infecciosa (amostra 06), 01 amostra *ompA* positiva associada a colonização (14), 01 amostra *ompA* positivo associada a doença infecciosa (amostra 16). Em seguida acrescentou-se a cada um dos tubos 1×10^6 células A549 e as amostras teste em concentrações de 1×10^9 , 1×10^8 e 1×10^7 UFC/ml. As amostras com 1×10^8 e 1×10^7 UFC/ml foram incubadas por 03 horas e a amostra a 1×10^9 UFC/ml por 01 hora. Os inóculos bacterianos foram preparados como já descrito no ítem b.

Após o período de incubação as células do controle negativo e as inoculadas foram lavadas com PBS gelado. As amostras foram centrifugadas a 300G por 03 minutos, lavadas com PBS gelado e re-centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em *IX annexin-binding buffer*. Foram adicionados 05 ml de Alexa Fluor® 488 annexin V e 1 μ L 100 μ g/mL de iodeto de propídio para cada 100 μ L de suspensão celular.

As células foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período foram adicionados, gentilmente, 400 μ L de *IX annexin-binding buffer* e as amostras foram colocadas no gelo. Imediatamente após o experimento procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™.

4.2.5.2 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno

Para a detecção de biofilme utilizou-se como referência o estudo de Ferreira (2009), com algumas modificações. Foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas por poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nunclon; Nunc InterMed). As amostras bacterianas analisadas foram semeadas por esgotamento em meio TSA e incubadas por 24 h a 37°C. Como controle positivo utilizou-se a linhagem de referência *A.baumannii* ATCC 19606 uma vez que esta linhagem é preconizada como controle positivo para ensaios com *A. baumannii*. Como controle negativo

utilizou-se caldo TSB sem alíquota bacteriana. Após esse período, uma alçada do crescimento de 24h foi repicada para tubos contendo 3 ml de TSB. Em seguida, foram aplicados 180 μ L de TSB em cada poço em triplicata, acrescidos de 20 μ L de alíquotas bacterianas a 0,5 na escala *McFarland*. Posteriormente, as placas foram incubadas por 4h a 37°C para avaliação da produção rápida de biofilme, por 24 h a 37°C, 24h a 25°C e 48h a 25°C. Após a incubação, os conteúdos da placa foram aspirados, os poços lavados 3 vezes com 200 μ L de PBS (0.01M, pH 7,2) e a placa foi colocada a temperatura ambiente para secar. Em seguida, 30 μ L de solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço por 10 minutos.

Após a coloração do biofilme o corante foi aspirado e os poços lavados três vezes com 200 μ L de PBS (0,01M, pH 7,2). A placa foi mantida à temperatura ambiente para secar e o corante foi eluído com 200 μ L de etanol absoluto por 10 minutos e 150 μ L da solução contida em cada um dos poços da placa foram transferidos para outra placa limpa e seca. A densidade ótica do biofilme (DO) foi quantificada através de um leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm e as amostras foram classificadas segundo Stepanović *et. al* (2000). As amostras foram classificadas em quatro categorias de acordo com a média das DOs (densidade ótica) relacionada com os resultados obtidos para as (DOc - densidade ótica do controle negativo). As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente (NA), quando $DO \leq DOc$; fracamente aderente (+) quando $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; moderadamente aderente (++) , quando $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ou fortemente aderente (+++), quando $4x DOc < DO$.

4.2.6. Detecção genotípica de betalactamases

Nesta etapa, foram realizados ensaios para pesquisa de sequências dos seguintes genes: *bla*_{VIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{OXA143} e *ISAba1*.

4.2.6.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

a) Extração do DNA bacteriano

Uma alíquota do crescimento bacteriano foi homogeneizada em 1mL de água estéril, até atingir a turvação correspondente ao valor de 0.5 da escala *McFarland*. Em

seguida esta suspensão foi incubada por 10 minutos a 95°C, para extração de DNA, e centrifugada sob refrigeração de 4 °C (MARTINS *et al.*, 2014; HAMMAMI *et al.*, 2011).

b) Preparo do Master-Mix

Nesta etapa foi utilizado o kit Master Mix (Promega[®], MADISON- WI USA) contendo: 500 units/ml de Taq DNA polimerase, 400µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de MgCl₂.

c) Condições de amplificação do DNA

As condições de amplificação de DNA dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{OXA-23,24}, 51, 58 e 143 e do elemento de inserção *ISAbal* ocorreram conforme descrito no Quadro 1.

Cada reação ocorreu com um volume final de 25 µL sendo 12,5 µl de Master Mix + 1,2 µL de *primers* F e R + 100 ng de DNA bacteriano extraído + água livre de nuclease, para completar o volume de 25 µl.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizados na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência.

Gene	Fenótipo de resistência/virulência	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Condições de amplificação	Amplicon	Referência
<i>bla_{VIM-1}</i>	Metalobetalactamase	CGAATGCGCAGCACCAG CTGGTGCTGCGCATTCCG	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 30x: 94°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 6 min	390 bp	YAN <i>et al.</i> , (2001)
<i>bla_{OXA-23}</i>	Oxacilinasas	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT		501 bp	
<i>bla_{OXA-24}</i>	Oxacilinasas	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 94°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min, Extensão final: 72°C, 8 min	246 bp	WOODFORD <i>et al.</i> , (2006)
<i>bla_{OXA-51}</i>	Oxacilinasas/ marcador da espécie	TAATGCTTTGATCGGCCTTG ATTTCTGACCGCATTTCAT		353 bp	
<i>bla_{OXA-58}</i>	Oxacilinasas	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC		599 bp	
<i>bla_{OXA-143}</i>	Oxacilinasas	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 94°C, 25 seg; 52°C, 40 seg; 72°C, 50 seg, Extensão final: 72°C, 6 min	149 bp	HIGGINS <i>et al.</i> , (2010)
<i>ISAbal</i>	Modulação da expressão de genes de resistência	CATTGGCATTAAACTGAGGAGA GACGAATACTATGACACATCTC	Desnaturação inicial 95°C, 5 min, 35x: 95°C, 45 seg; 56°C, 45 seg; 72°C, 3 min, Extensão final: 72°C, 5 min	549 bp	TURTON <i>et al.</i> , (2006)
<i>ompA</i>	Indução de apoptose em células epiteliais	GATGGCGTAAATCGTGGTA CAACTTTAGCGATTTCTGG	Desnaturação inicial 94°C, 3 min, 30x: 94°C, 45 s; 57°C, 45 s; 72°C, 1 min, Extensão final: 72°C, 10 min	355 bp	TURTON <i>et al.</i> , (2007)
<i>csuE</i>	Formação de biofilme em superfícies abióticas	CTTTAGCAAACATGACCTACC TACACCCGGGTTAATCGT		702 bp	

d) Eletroforese

A eletroforese dos produtos obtidos pela PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5%, para as bandas de 189 pb, 271pb, 390 pb (1,2g+ 80 mL tampão TAE) e a 1,2%, para as bandas com tamanhos 477 pb, 571 pb, 631 pb, 501 pb, 246pb, 599 pb (0,96 g + 80 mL tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)).

A corrida foi de, aproximadamente, 120 minutos a 90 volts. Os géis foram submersos no tampão de coloração (15µl Gel red 10.000 X (Biotium, USA) + 45 água + 5 mL NaCl) sob agitação, durante 30 minutos, e as imagens capturadas sob Luz ultravioleta em um fotodocumentador. Como padrão de DNA, utilizou-se o marcador de 100 pb DNA ladder (Promega[®], MADISON- WI USA).

4.2.7 Detecção genotípica de fatores de virulência

4.2.7.1 Detecção de genes associados à indução de apoptose em células epiteliais e formação de biofilme

Para a identificação dos genes *ompA* relacionado à indução de apoptose em células epiteliais e do gene *csuE*, associado à formação de biofilme em superfícies abióticas, foi realizado uma PCR multiplex. A extração do DNA bacteriano e preparo do Master Mix se deu como descrito no item 4.2.6.1. Os primers utilizados e as condições de amplificação estão descritos no Quadro 1.

4.2.8 Caracterização do perfil genético das amostras

A caracterização dos perfis genéticos das amostras bacterianas foi obtida após amplificação por reação da polimerase em cadeia, utilizando iniciadores para sequências conservadas intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR).

4.2.8.1 Análise das sequências intergênicas repetitivas consenso enterobacterianas – ERIC

a) Extração de DNA bacteriano e preparo do Master-Mix

A extração do DNA bacteriano e o preparo do Master-mix ocorreram conforme proposto por Martins *et al.* (2014) e já descrito no item 4.2.6.1. Os iniciadores utilizados e suas sequências estão dispostas no Quadro2.

b) Condições de amplificação do DNA

As condições para a reação de amplificação foram propostas por MARTINS *et al.*, (2014):

- 95°C iniciais por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de:
- Desnaturação a 90°C por 30 segundos
- Anelamento a 52°C por 1 minuto
- Extensão a 65°C por 8 minutos

c) Eletroforese

Realizou-se a eletroforese dos produtos obtidos pela PCR em gel de agarose 1,5%. A corrida foi de, aproximadamente, 120 minutos, a 90 volts.

Quadro 2 – Iniciadores utilizados para a análise por ERIC-PCR das amostras de *A.baumannii* avaliadas

Iniciadores	Sequências	Referências
ERIC1 R	5' TGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'	MARTINS <i>et al.</i> , 2014
ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	MARTINS <i>et al.</i> , 2014

Legenda: ERIC: *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*

c) Interpretação dos resultados

As amostras de *A.baumannii* obtidas foram denominadas numericamente em ordem crescente. A amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita utilizando-se como molde o DNA extraído dos 62 amostras de *A. baumannii* e um par de iniciadores previamente descritos por Martins *et al.* (2014).

Para a confecção do dendrograma foi construída uma matriz binária baseada na presença (1) ou na ausência (0) de cada fragmento amplificado por PCR. O agrupamento dos fragmentos da matriz foi feito pelo programa NTSYS v. 2.1 (ROHLF, 2000) utilizando a média aritmética ponderada (*Unweighted Pair Group Method algorithm* - UPGMA). O grau de similaridade genotípica entre as amostras foi dado pelo coeficiente Sorensen-Dice calculado pelo programa NTSYS.

4.2.9 Controle de qualidade das reações

Para o controle de qualidade das reações foram utilizadas a linhagem de referência *A.baumannii* ATCC 19606. Como controle negativo para todos os testes fenotípicos, foram utilizados o meio padrão sem inóculo bacteriano.

4.3 Pacientes

Trinta e sete pacientes dentre o total de indivíduos dos quais foram obtidos os espécimes de *A.baumannii* incluídos neste estudo foram caracterizados segundo aspectos clínicos e epidemiológicos. Ademais, realizou-se análise do impacto da presença de alguns fatores de virulência identificados nas amostras avaliadas e o desfecho clínico desse grupo de pacientes. Nos pacientes com mais de uma amostra clínica de *A.baumannii* as análises comparativas e de associação foram realizadas considerando-se a primeira amostra, ou seja, aquela que determinou a inclusão do paciente no estudo.

Em linhas gerais, as variáveis clínico-epidemiológicas consideradas foram:

- Dados demográficos: idade, sexo;
- Comorbidades;
- APACHE II à admissão em UTI (quando aplicável);
- Uso de antibióticos nos últimos 90 dias;
- Internação nos últimos 90 dias;
- Sítio(s) de isolamento do microrganismo de interesse;
- Gravidade da infecção;
- Ocorrência de infecção pelo microrganismo de interesse;
- Ocorrência de sepse;
- SOFA no dia de internação em UTI (quando aplicável)

- Tempo de internação.

4.4 Análise estatística dos dados

Os dados coletados foram processados em banco de dados criado especificamente para este projeto (plataforma Windows Excel, 2000, Microsoft Corp, Redmond, USA), e então convertidos em arquivos SPSS para análise (SPSS 13.0, Chicago, USA). Variáveis categóricas foram expressas em porcentagem e as contínuas como média \pm desvio padrão (DP) ou como mediana (percentil 25% e percentil 75%) quando houve distribuição não-Gaussiana dos dados. Os dois grupos foram comparados por meio de testes de χ^2 ou teste T de Student / teste U Mann-Whitney, conforme a indicação. Os resultados foram apresentados de forma não ajustada e com análise multivariada através de riscos relativos e os seus respectivos intervalos de confiança 95%.

Para a descrição das variáveis contidas nos resultados de biologia molecular, ensaios fenotípicos e perfil de resistência foram utilizadas as frequências absoluta e relativa. Para verificar a correlação entre as variáveis, foram calculadas as correlações policóricas e tetracóricas (LEE *et al.*, 1995) (BONETT e PRICE, 2005). A correlação policórica é utilizada para estimar a correlação a partir de duas variáveis ordinais, enquanto que a correlação tetracórica é um caso especial da anterior em que as duas variáveis ordinais são dicotômicas. Para verificar quais correlações eram significativas, foi realizado o teste de associação linear (AGRESTI, 2002).

De forma a visualizar graficamente como as variáveis se relacionavam, foi feito um mapa perceptual via Análise de Componentes Principais (MINGOTI, 2007).

A amostragem referente aos ensaios de avaliação de morte celular foi composta por 1620 observações divididas em 4 amostras bacterianas, 3 períodos de incubação e 9 concentrações distintas de cada inóculo bacteriano. Para descrever as variáveis foram utilizadas a mediana, a média e o erro padrão. Para comparar as curvas do número de células nas diferentes concentrações entre tipos de bactérias e tempo foi utilizado o teste de Wilcoxon (SIEGAL e CASTELLAN, 2006) com as devidas correções de Holm-Bonferroni (HOLM, 1979). O software utilizado na análise foi o R versão 3.0.2.

5. RESULTADOS

5.1 Confirmação molecular da identificação das amostras

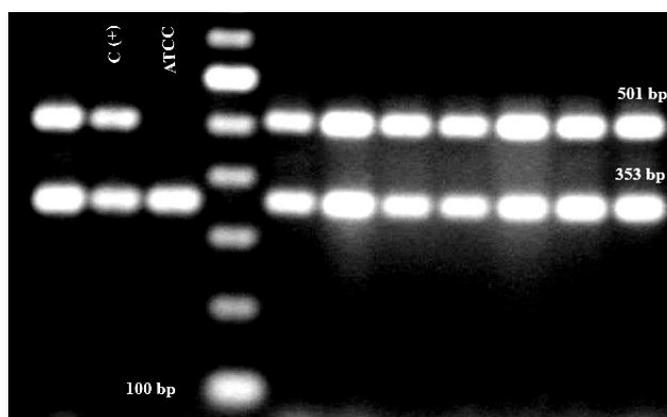
Das 66 amostras elegíveis para o estudo, 62 foram positivas para o gene *bla*_{OXA51}, sendo destas, 61 positivas para os genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51} ao mesmo tempo (TABELA 2). Uma única amostra foi positiva somente para o gene *bla*_{OXA51}. Três amostras foram negativas para todos os genes pesquisados, sendo que todas as três pertenciam ao grupo dos pacientes colonizados. Uma amostra foi excluída devido à sua morfologia colonial e visualização microscópica após coloração pelo Gram serem incompatíveis com as características típicas de *Acinetobacter* spp. Nenhuma amostra foi positiva para os genes *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58}. A Tabela 2 apresenta os resultados encontrados.

Todas as amostras incluídas na pesquisa, além de apresentarem o perfil definido nos critérios de inclusão, apresentaram também a presença do gene *bla*_{OXA51} marcador genético de espécie.

Tabela 2 - Resultado da Multiplex PCR para os genes *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51} e *bla*_{OXA58} das amostras de *A. baumannii* avaliadas

Perfil genotípico	Frequência	%
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA24} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{OXA58}	0	0
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51}	61	98,4%
<i>bla</i> _{OXA51}	01	1,6%

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de Multiplex PCR para pesquisa dos genes *bla*_{OXA23}/*bla*_{OXA24}/*bla*_{OXA51}/*bla*_{OXA58} em amostras clínicas de *A. baumannii*

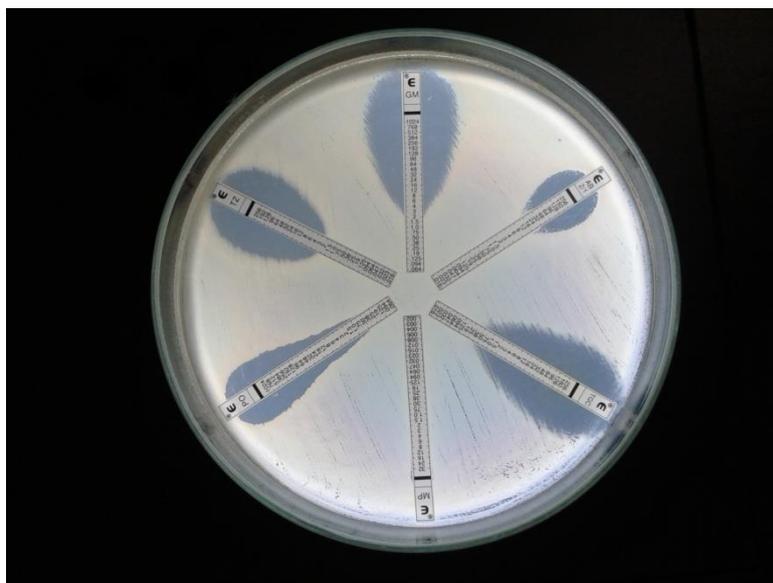


Legenda: C(+): Controle positivo; bp, pares de bases, fragmento 501 bp correspondente a *bla*_{OXA23} e fragmento 353 bp, correspondente a *bla*_{OXA51}

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)- *Epsilon* test (Etest®)

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, a Tabela 3 apresenta os valores encontrados, nas 62 amostras testadas. Ressalta-se que a grande maioria das amostras (98,4%) foi resistente a meropenem e 71% a ceftazidime. Em contrapartida, 98,4% das amostras se mostraram sensíveis à polimixina B e 67,7% à gentamicina. O CLSI e o *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) não definem pontos de corte para a CIM de tigeciclina e ampicilina/sulbactam em *A. baumannii*. Sendo assim, utilizamos, para tigeciclina, os valores definidos pela BSAC (2014) e para ampicilina/sulbactam os valores determinados pelo CLSI (2013) para *Enterobacteriaceae*, conforme estudo de De Oliveira *et al.* (2013). Os demais antimicrobianos foram avaliados conforme CLSI (2014). A Figura 4 apresenta um dos resultados encontrados através do Etest® quanto à caracterização do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Figura 4 – Resultado de Etest® para os antimicrobianos testados em uma das amostras clínicas de *A.baumannii* avaliadas.



Legenda: TZ: Ceftazidime, GM: Gentamicina, AB: Ampicilina/Sulbactam, TGC: Tigeciclina, MP: Meropenem. O valor da CIM é lido no ponto de intersecção entre o halo e a fita de Etest®.

Tabela 3 - Susceptibilidade a antimicrobianos de 62 amostras de *Acinetobacter baumannii*, de acordo com seu perfil: sensíveis (S), com resistência intermediária (I) e com resistência plena (R).

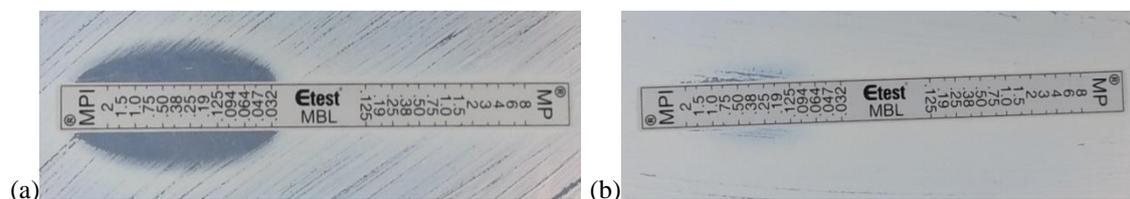
Antimicrobianos	Padrões de susceptibilidade (%)				
	CIM _{50%} (n)	CIM _{90%} (n)	S	I	R
Ampicilina/Sulbactam	16	32	1,6	37,1	61,3
Ceftazidime	256	256	25,8	3,2	71,0
Gentamicina	2	192	67,7	8,1	24,2
Meropenem	32	32	1,6	0	98,4
Polimixina B	0,5	0,5	98,4	1,6	0
Tigeciclina	0,50	0,75	17,7	33,9	48,4

Percebe-se, pelos dados informados na Tabela 3 que, 48,4% das amostras testadas foram resistentes à tigeciclina e 33,9% apresentaram resistência intermediária a este agente, de acordo com os pontos de corte estabelecidos pela BSAC (2014). Em relação à susceptibilidade à ampicilina/sulbactam, 61,3% das amostras apresentaram resistência plena e 37,1% destas, resistência intermediária a este antimicrobiano.

5.3 Pesquisa fenotípica de metalobetalactamases (MβL)

Em relação à pesquisa fenotípica de metalobetalactamases, 95,2% foram positivas para detecção desta enzima. As Figuras 5a e 5b apresentam resultados positivos (MP/MPI >8) e negativos (MP/MPI <8), respectivamente.

Figura 5 - Resultados para pesquisa fenotípica de metalobetalactamases em uma das amostras clínicas de *A.baumannii* avaliadas

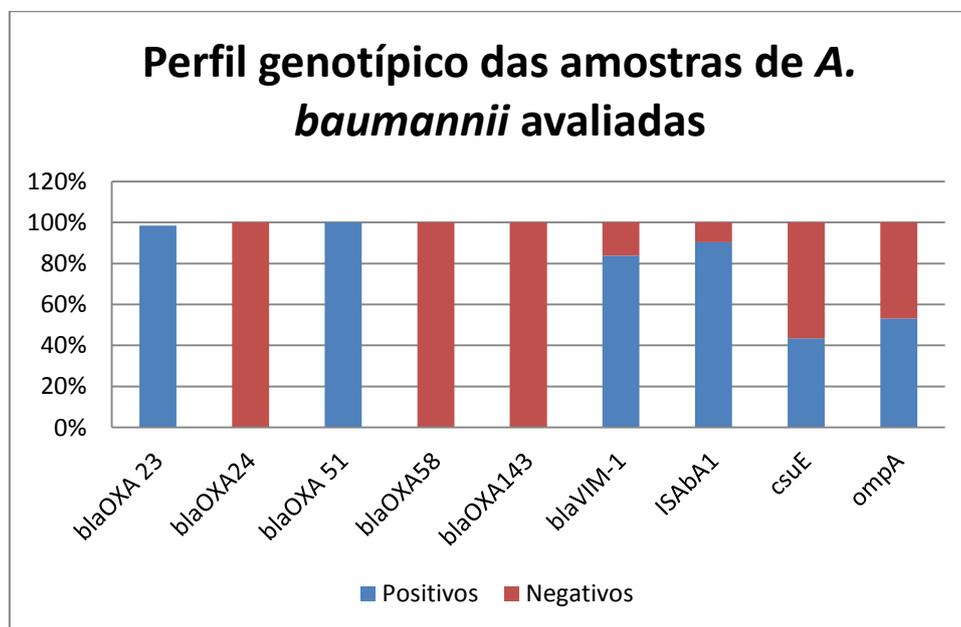


Legenda: (a) Resultado positivo de Etest para pesquisa de metalobetalactamase e em (b) resultado negativo.

5.4 Detecção genotípica de fatores de resistência e virulência

Todas as amostras avaliadas foram positivas para a presença do gene *bla*_{OXA51} e 98,4% para *bla*_{OXA23}, 83,9% foram positivas para *bla*_{VIM-1} e 90,3% para *ISAbal*. Todas as amostras testadas foram negativas para a presença dos genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{OXA143}. Quanto aos genes estudados associados aos fatores virulência, 43,5% das amostras apresentaram o gene *csuE* e 53,2% o gene *ompA*. O Gráfico 1 apresenta os resultados obtidos.

Gráfico 1 – Perfil genotípico de marcadores de resistência a antimicrobianos e virulência das amostras de *A.baumannii* avaliadas



A Tabela 4 mostra os dados referentes à frequência da combinação de genes pesquisados em amostras de *A. baumannii*, sendo *bla*_{OXA23}/*bla*_{OXA51}/*bla*_{VIM-1}/*ISAbal* /*csuE*/ *ompA* e *bla*_{OXA23}/*bla*_{OXA51}/*bla*_{VIM-1}/*ISAbal* as mais frequentes.

Tabela 4 - Frequência da combinação de genes carregados pelas amostras de *Acinetobacter baumannii* avaliadas (n=62)

Perfil genotípico	Frequência	%
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1} / <i>ISAb</i> ₁ / <i>csuE</i> / <i>ompA</i>	19	30,6
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1} / <i>ISAb</i> ₁	19	30,6
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1} / <i>ISAb</i> ₁ / <i>ompA</i>	08	13,1
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>ISAb</i> ₁ / <i>csuE</i> / <i>ompA</i>	04	6,5
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1} / <i>ISAb</i> ₁ / <i>csuE</i>	03	4,8
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>ISAb</i> ₁	03	4,8
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1}	03	4,8
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51}	02	3,2
<i>bla</i> _{OXA51} / <i>bla</i> _{VIM-1} / <i>ISAb</i> ₁ / <i>csuE</i> / <i>ompA</i>	01	1,6
TOTAL	62	100

A tabela seguinte (TABELA 5) apresenta o dado relativo à presença do elemento de inserção *ISAb*₁ *upstream* aos genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51} e a correlação com o perfil de resistência a carbapenêmicos obtidos após análises da CIM pelo Etest®.

Tabela 5 – Frequência da associação entre *bla*_{OXA23}/*bla*_{OXA51}/*ISAb*₁ e a expressão de resistência à carbapenêmicos.

Perfil genotípico	Frequência/%	Resistência a meropenem (%)
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51} / <i>ISAb</i> ₁	55 (88,7%)	100
<i>bla</i> _{OXA23} / <i>bla</i> _{OXA51}	06 (9,7%)	100
<i>bla</i> _{OXA51} / <i>ISAb</i> ₁	01 (1,6%)	0

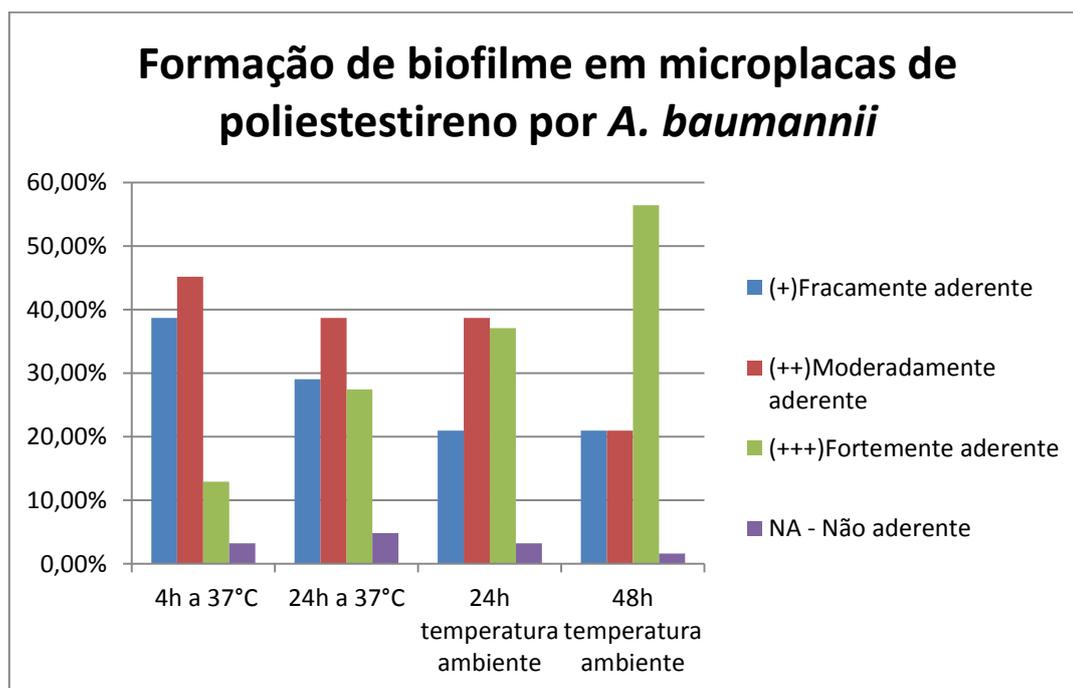
Percebe-se que 88,7% das amostras apresentaram *ISAb*₁ *upstream* a *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51}, concomitantemente, sendo todas essas amostras, resistentes ao meropenem. Naquelas amostras (9,7%) em que *ISAb*₁ não foi verificado *upstream* a nenhum dos dois genes, *bla*_{OXA23} ou *bla*_{OXA51}, observou-se a manutenção da resistência a carbapenêmicos. No entanto, na amostra na qual o gene *bla*_{OXA23} não esteve presente, mesmo na presença de *ISAb*₁ e *bla*_{OXA51}, foi observado perfil de sensibilidade ao meropenem.

5.5 Detecção fenotípica de fatores de virulência

5.5.1 Formação de biofilme

Os resultados referentes à formação de biofilme em microplacas de poliestireno são mostrados no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Formação de biofilme em microplacas de poliestireno pelas 62 amostras clínicas de *A.baumannii* avaliadas



Quanto às amostras incubadas à 37°C, 96,78% apresentaram formação de biofilme com 4h de incubação. Destas, 38,71% foram caracterizadas como fracamente aderente, 45,16% como moderadamente aderente, 12,91% como fortemente aderente e 3,22% foram não aderentes nestas condições. 95,16% apresentaram crescimento a 37°C por 24h, sendo que 29,03%, 38,71% e 27,42% delas foram consideradas fracamente aderentes, moderadamente aderentes e fortemente aderentes, respectivamente. 4,84% foram não aderentes. Já em relação às amostras incubadas à temperatura ambiente, 96,78% formaram biofilme quando incubadas por 24h. Destas, 20,97% foram fracamente aderentes, 38,71% moderadamente aderentes, 37,10% fortemente aderentes. 3,22% das amostras testadas foram caracterizadas como não aderentes. Quando incubadas por 48h em temperatura ambiente, 1,62% foram consideradas não aderentes e 98,38% das amostras apresentaram formação de biofilme, sendo que 20,97% destas foram fracamente e moderadamente aderentes e 56,44% foram caracterizadas como fortemente aderentes.

Ao associar os dados fenotípicos aos da presença de genes relacionados à formação de biofilme (TABELA 6) identificamos que todas as amostras nas quais o gene *csuE* (56,5% do total) esteve ausente produziram biofilme. Quando *csuE* e *ompA* estiveram ausentes (40,3%), concomitantemente, a produção de biofilme também foi observada, assim como quando *csuE* esteve ausente e *ompA* presente.

Tabela 6 - Frequência da associação entre *csuE*, *ompA* e a formação de biofilme em microplacas de poliestireno.

Perfil genotípico	Frequência/%	Formação de biofilme (%)
<i>csuE e ompA ausentes</i>	25 (40,3%)	100
<i>csuE/ompA</i>	23 (37%)	100
<i>ompA</i>	10 (16,1%)	100
<i>csuE</i>	04 (6,4%)	100

Os dados referentes à associação entre o perfil genotípico (*csuE*, *ompA* e *ISAbA1*), perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em microplacas de poliestireno são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Associação entre o perfil genotípico (*csuE*, *ompA* e *ISAbA1*), perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em microplacas de poliestireno de amostras clínicas de *A. baumannii*

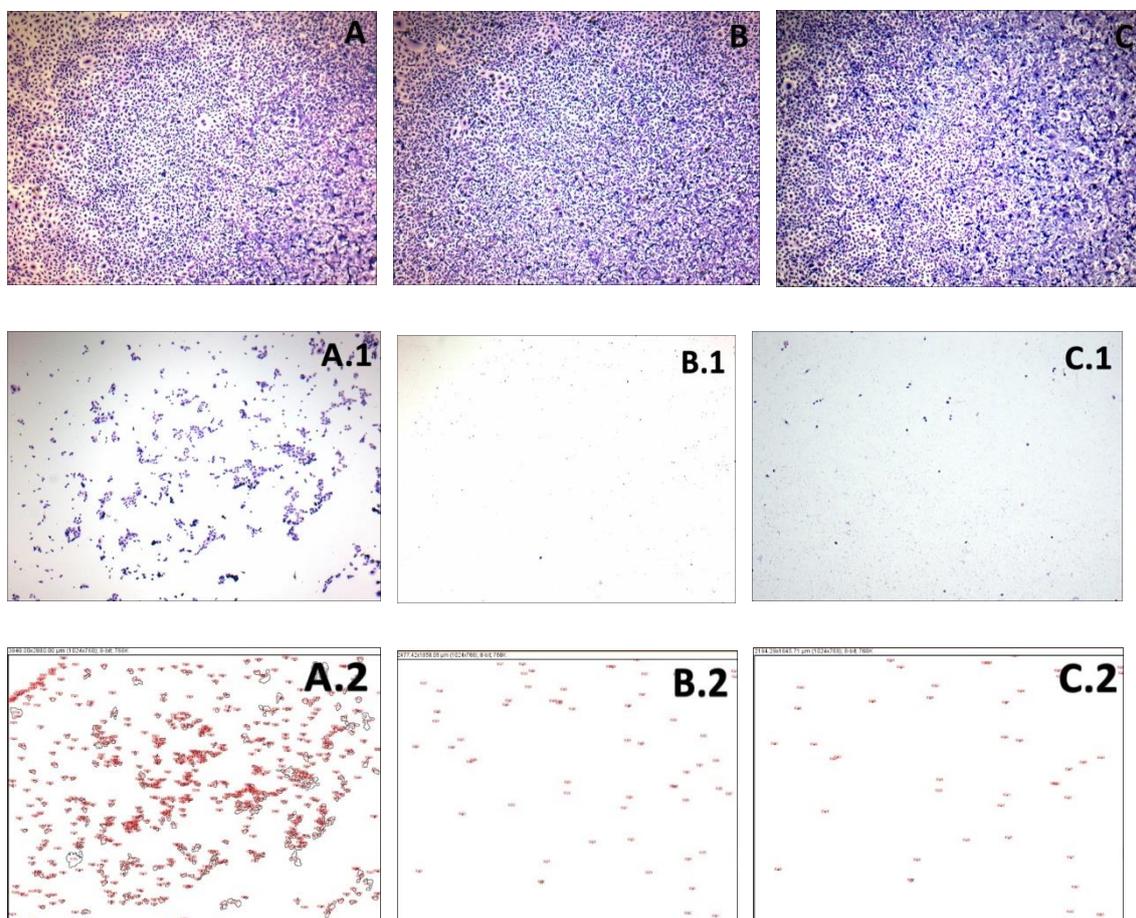
Perfil genotípico	Frequência / %	ISAbA 1		Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos																		Formação de biofilme (%)
		Frequência / %		Ampicilina/Sulbactam			Gentamicina			Ceftazidime			Tigeciclina			Polimixina B			Meropenem			
		Positivo	Negativo	Frequência / %																		
				S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<i>csuE</i> e <i>ompA</i> ausentes	25 (40,3%)	51 (91%)	5 (9%)	0/0	8 (32%)	17 (68%)	13 (52%)	3 (12%)	9 (36%)	10 (40%)	1 (4%)	14 (56%)	4 (16%)	2 (8%)	19 (76%)	24 (96%)	1 (4%)	0/0	0/0	0/0	25 (100%)	100
<i>csuE/ompA</i>	23 (37%)	24 (43%)	32 (57%)	1 (4,3%)	8 (34,8%)	14 (60,9%)	21 (91,3%)	2 (8,7%)	0/0	0/0	0/0	23 (100%)	1 (4,3%)	12 (52,1%)	10 (43,4%)	23 (100%)	0/0	0/0	1 (4,3%)	0/0	22 (95,7%)	100
<i>ompA</i>	10 (16,1%)	9 (16%)	47 (84%)	0/0	5 (50%)	5 (50%)	5 (50%)	0/0	5 (50%)	5 (50%)	1 (10%)	4 (40%)	5 (50%)	4 (40%)	1(10%)	10 (100%)	0/0	0/0	0/0	0/0	10 (100%)	100
<i>csuE</i>	04 (6,4%)	4 (7%)	52 (93%)	0/0	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)	0/0	1 (25%)	1 (25%)	0/0	3 (75%)	1 (25%)	0/0	3 (75%)	4 (100%)	0/0	0/0	0/0	0/0	4 (100%)	100

91% das amostras estudadas apresentaram ISAbal quando a pesquisa para os genes *csuE* e *ompA* foi negativa, sendo a maioria destas amostras (52%), sensíveis à gentamicina e 76% resistentes a tigeciclina. Uma única amostra apresentou sensibilidade intermediária à polimixina. Quando ambos os genes estiveram presentes (*csuE* e *ompA*), ISAbal foi identificado em somente 43% das amostras e a sensibilidade à gentamicina alcançou 91,3% , sendo que uma única amostra (4,3%) apresentou sensibilidade também a meropenem. A formação de biofilme ocorreu, em algum grau de aderência nas diferentes condições e temperaturas de incubação em 100% das amostras analisadas.

5.5.2 Avaliação da indução de morte celular e apoptose

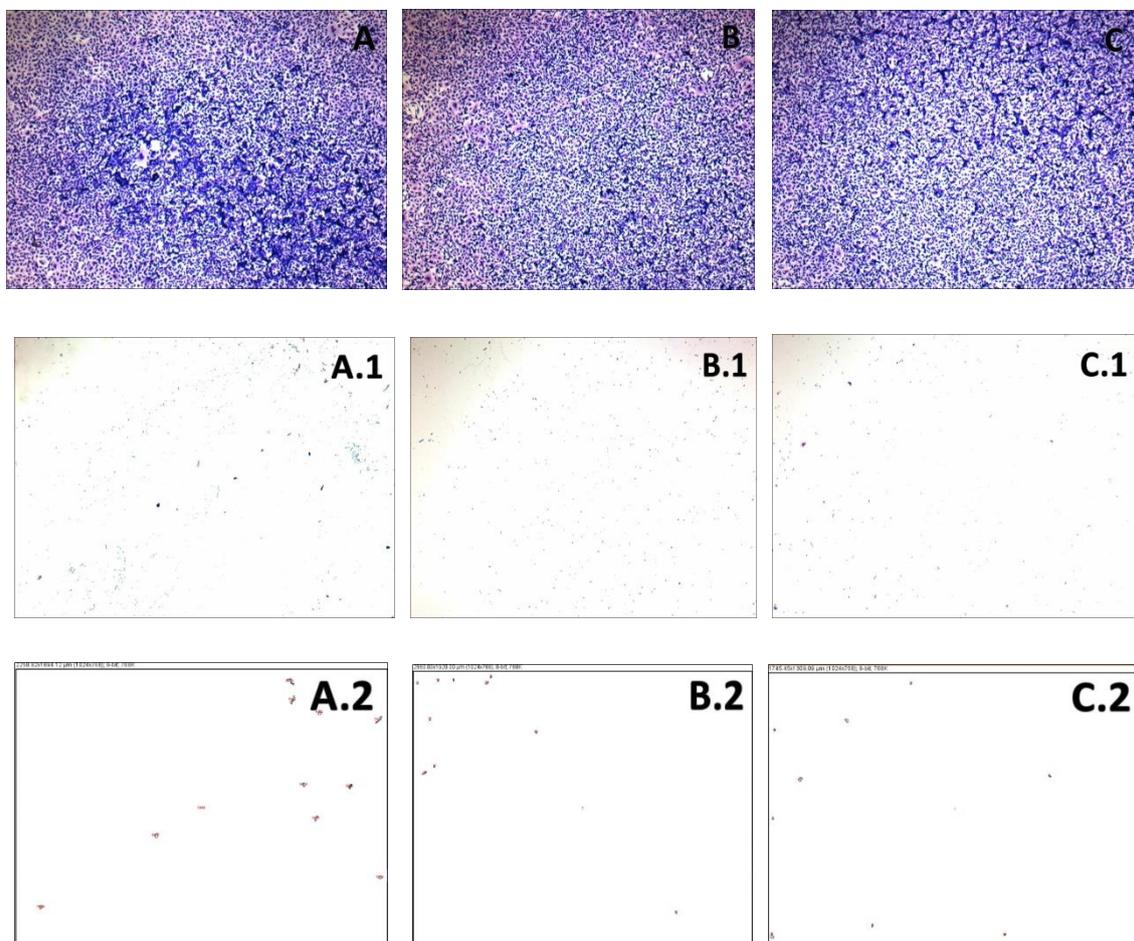
As Figuras 6 e 7 ilustram os ensaios em lamínulas para verificação de morte celular após a inoculação de diferentes amostras de *A.baumannii* (*ompA* positivo versus *ompA* negativo) em células A549.

Figura 6 – Infecção de células A549 por *A.baumannii* em lamínulas de vidro. Amostra 06, *ompA* negativo.



Legenda: Controle de células A549 sem inóculo bacteriano por 24 h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação. Após 24h (A.1), 48h (B.1) e 72h (C.1) de incubação com *A.baumannii* na concentração 1×10^8 UFC/ml. A.2, B.2 e C.2 representam a contagem de células pelo software ImageJ®.

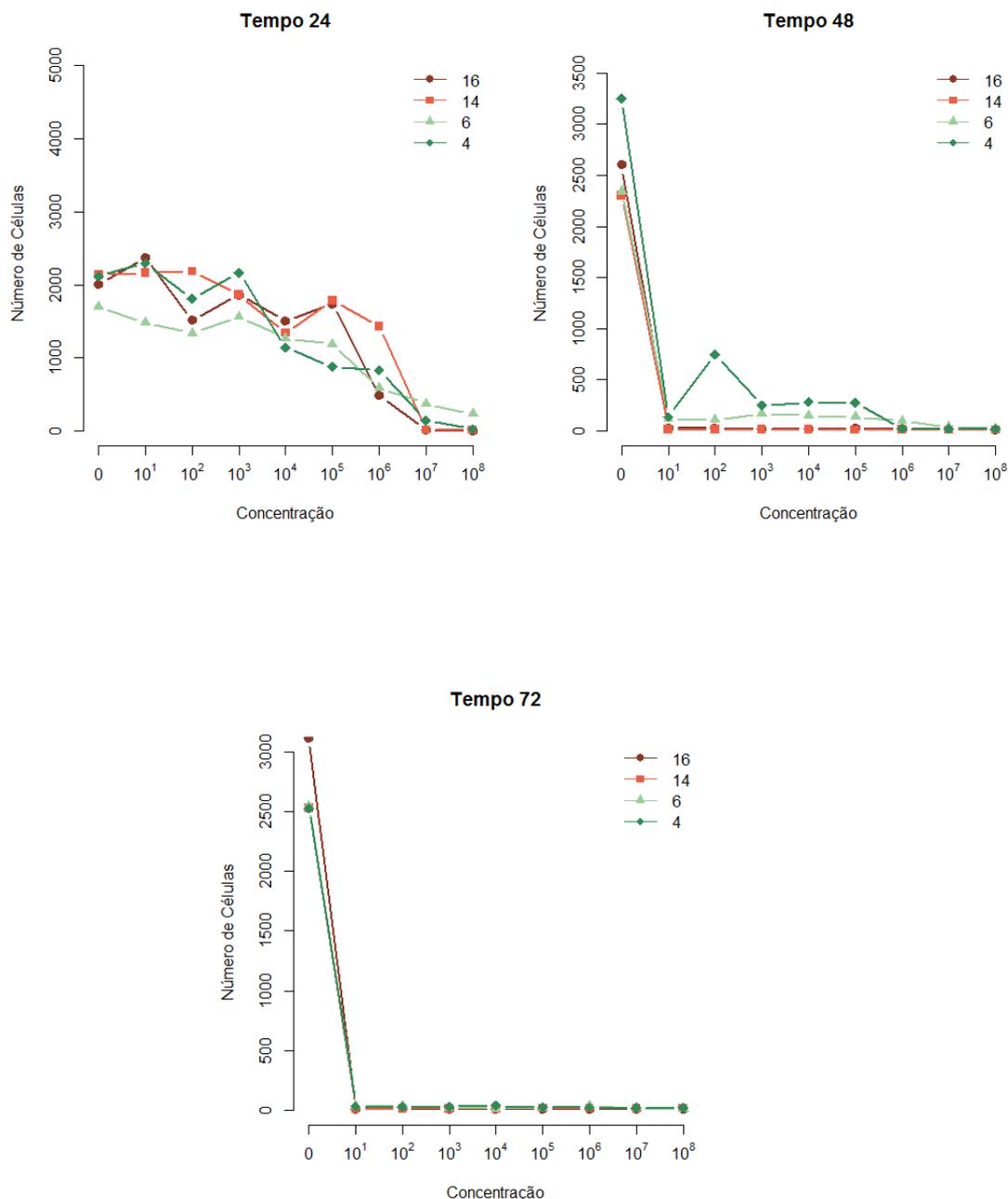
Figura 7 - Infecção de células A549 por *A.baumannii* em lamínulas de vidro. Amostra 16, *ompA* positivo.



Legenda: Controle de células A549 sem inóculo bacteriano por 24 h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação. Após 24h (A.1), 48h (B.1) e 72h (C.1) de incubação com *A.baumannii* na concentração 1×10^8 UFC/ml. A.2, B.2 e C.2 representam a contagem de células pelo software ImageJ®.

Os gráficos (GRÁFICO 3) seguintes apresentam os resultados dos ensaios de cultura de células em lamínulas com o inóculo de *A.baumannii* em diferentes concentrações e períodos de incubação.

Gráfico 3 - Comparação entre o número de células A549 sobreviventes em diferentes concentrações de amostras bacterianas e períodos de incubação.



Legenda: 06: 4: amostra 4 (*ompA* negativo/colonização); 6: amostra 06 (*ompA* negativo/doença infecciosa); 14: amostra 14 (*ompA* positivo/colonização); 16: amostra 16: (*ompA* positivo/doença infecciosa); Tempo 24: incubação por 24h; Tempo 48: incubação por 48h; tempo 72: incubação por 72h. Concentração: concentração do inóculo bacteriano

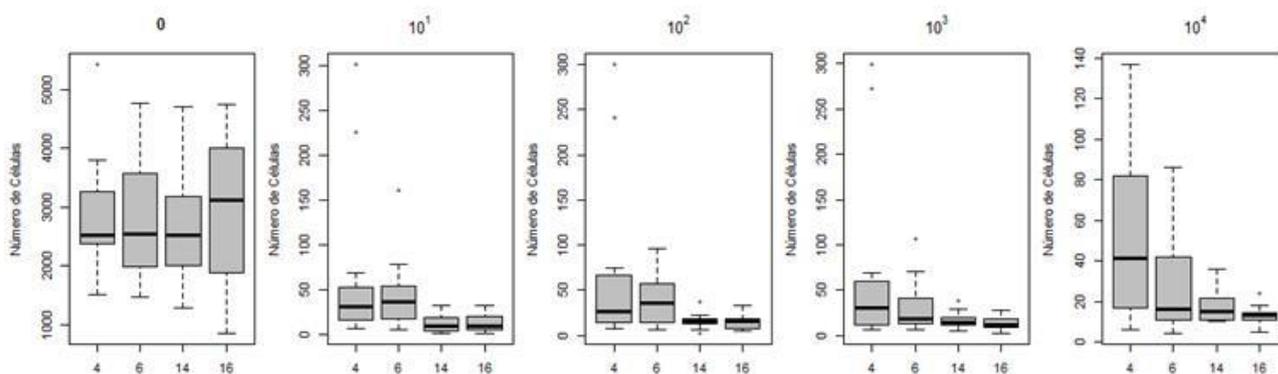
Em 24h de incubação, pode-se dizer que as curvas obtidas após infecção em células para todas as amostras avaliadas não foram significativamente diferentes entre si, visto que pelo teste de Wilcoxon, após aplicar a correção de Holm-Bonferroni, todas as comparações apresentaram um valor-p acima de 0,05.

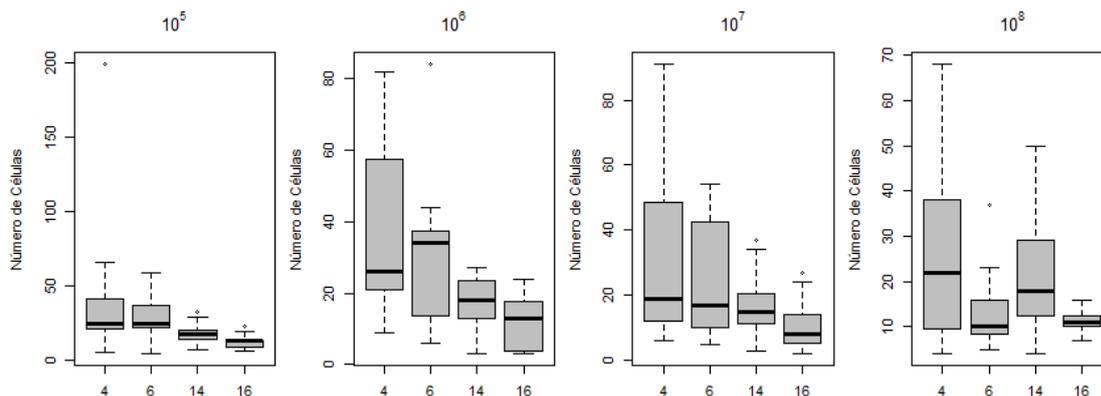
Em 48h de incubação, a curva da amostra 14 apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$; $0,000$ e $0,000$) abaixo do das amostras 16, 06 e 04 ao longo das concentrações. A curva da amostra 16 também apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$ e $0,000$), abaixo daqueles observados nas 06 e 04 ao longo das concentrações. Não houve evidências suficientes ($p=0,094$) para afirmar que os valores medianos da bactéria 06 foram diferentes ao longo das concentrações que o da bactéria 04.

Em 72h de incubação, a curva da amostra 16 apresentou valores medianos significativamente ($p=0,008$; $0,000$ e $0,000$) abaixo do das amostras 06 e 04 e acima do da amostra 14 ao longo das concentrações. A curva da amostra 16 também apresentou valores medianos significativamente ($p=0,001$ e $0,000$) abaixo do das bactérias 06 e 04 ao longo das concentrações. Não houve evidências suficientes ($p=0,142$) para afirmar que os valores medianos da amostra 06 foram diferentes ao longo das concentrações do da amostra 04.

Para melhor visualização da diferença estatisticamente significativa entre as amostras por 72h, estratificamos os dados em gráficos individualizados de cada concentração bacteriana. (GRÁFICO 4).

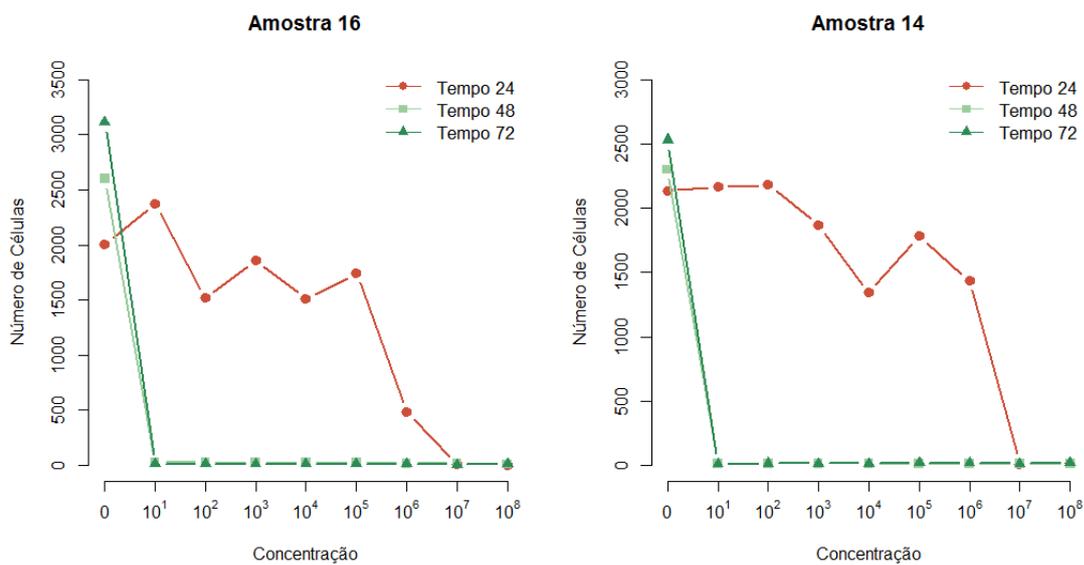
Gráfico 4 - Comparação do número de células entre as diferentes concentrações das amostras bacterianas em 72h de incubação.

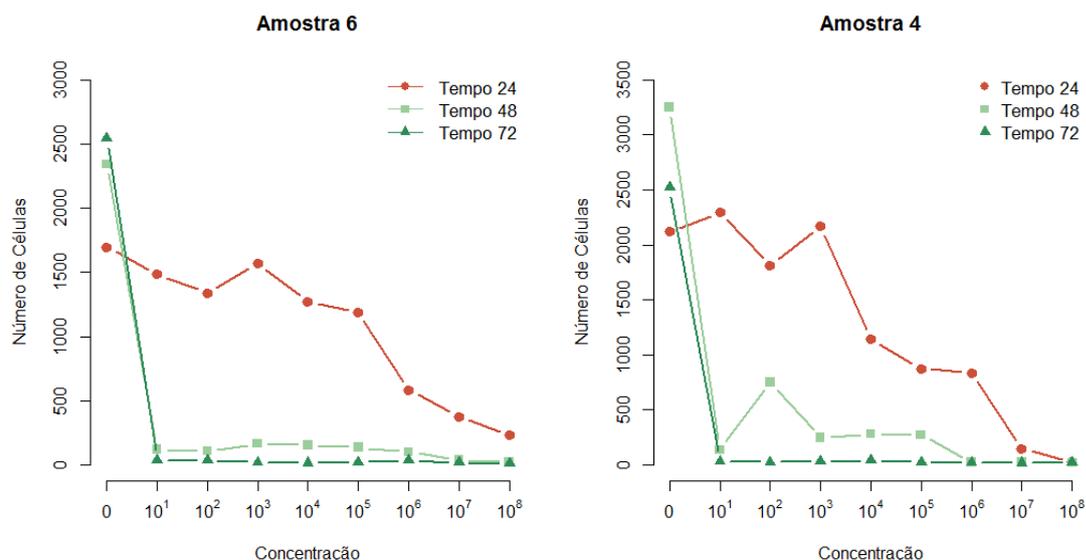




Os gráficos seguintes (GRÁFICO 5) representam o comportamento de cada amostra em cada período de incubação, possibilitando a visualização da interferência do período de incubação célula-bactéria no resultado quantitativo das células restantes.

Gráfico 5 - Comparação entre o número de células A549 sobreviventes em diferentes concentrações de amostras bacterianas após 24, 48 e 72 horas de incubação.





Legenda: Tempo 24: incubação por 24h; Tempo 48: incubação por 48h; tempo 72: incubação por 72h. Concentração: concentração do inóculo bacteriano

A curva da amostra 16, no período de incubação de 24h apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$ e $0,000$) maiores do que os dos tempos 48h e 72h ao longo das concentrações. A curva relativa à incubação por 48h também apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$) maiores do que os de incubação por 72h ao longo das concentrações.

Em relação à amostra 14, a curva para incubação por 24h apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$ e $0,000$) maiores do que os dos tempos 48h e 72h ao longo das concentrações. A curva para incubação por 48h apresentou valores medianos significativamente ($p=0,005$) menores do que os do tempo 72h ao longo das concentrações.

Já para a amostra 06, a curva representativa da incubação por 24h apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$ e $0,000$) maiores do que para os tempos 48h e 72h ao longo das concentrações. A curva para 48h de incubação também apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$) maiores que por 72h de incubação ao longo das concentrações.

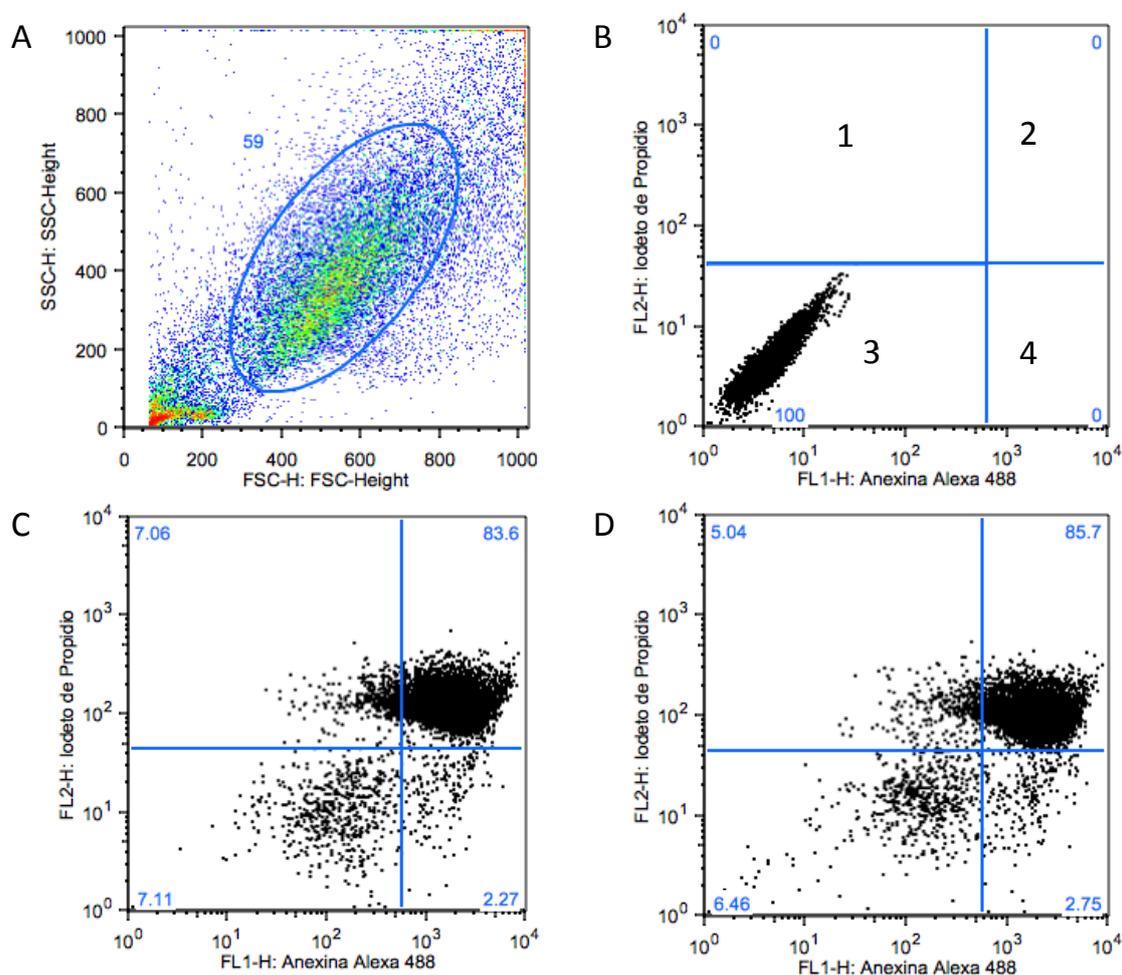
Por fim, a amostra 04 apresentou valores medianos significativamente ($p=0,000$ e $0,000$) maiores quando incubada por 24h do que aqueles de 48 e 72h de incubação ao longo das concentrações. A curva para incubação por 48h também apresentou valores

medianos significativamente ($p=0,000$) maiores do que por 72h ao longo das concentrações.

As informações já apresentadas pelos gráficos podem ser vistas também no Anexo D.

Em relação aos ensaios para análise da morte celular induzida pelo *Acinetobacter baumannii* em células da linhagem A549 “*in vitro*”, a Figura 8 mostra a estratégia de análise de morte celular por citometria de fluxo utilizando-se os marcadores de morte Anexina V e Iodeto de Propídio.

Figura 8 - Análise da morte celular induzida pelo *Acinetobacter baumannii* em células da linhagem A549 “*in vitro*”



Legenda: SSC – Side Scatter; FSC Foward Scatter

Em (A) temos o perfil apresentado pelas células em cultura, mostrando seu tamanho e granulosidade (FSC x SSC). Em (B) temos uma amostra de controle negativo para IP x Anexina V mostrando os quadrantes de análise de morte celular. O quadrante 1 representa células necróticas, o quadrante 2 células em apoptose de estágio avançado, o quadrante 3 células vivas e o quadrante 4 células em estágio inicial de apoptose. 1×10^6

células/ ml da linhagem A549 foram colocadas em tubos de ensaio estéreis na presença de 1×10^8 UFC/ml das amostras 6 (C) e da amostra 14 (D) e mantidas por 3 horas a 37°C em estufa de CO₂. Os resultados foram analisados em um BD FACSCalibur™ de 4 cores.

A Figura 8 demonstra resultados semelhantes para as duas amostras analisadas. Em apenas 03 horas, 83,6% das células inoculadas com a amostra 06 [(C) *ompA* negativa] e 85,7% das células A549 inoculadas com a amostra 14 [(D) *ompA* positivo] já se encontravam em estágio avançado de apoptose. 2,27% das células expostas à amostra 06 e 2,75% das células expostas à amostra 14 estavam nos estágios iniciais da apoptose. Em média 9,6% das células testadas com ambas as amostras encontravam-se em necrose. Poucas células viáveis foram identificadas, variando entre 7,11% para a amostra 06 e 6,46% para a amostra 14.

5.6 Correlação estatística entre as variáveis analisadas

Nas Tabelas 8 e 9 foram apresentadas as correlações policóricas e tetracóricas para as variáveis em estudo. A correlação policórica é utilizada para estimar a correlação a partir de duas variáveis ordinais, enquanto que a correlação tetracórica é um caso especial da anterior em que as duas variáveis ordinais são dicotômicas.

A correlação policórica e tetracórica é uma medida de correlação limitada entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo o coeficiente estiver de -1 maior a correlação negativa e quanto mais próximo o coeficiente estiver de 1 maior a correlação positiva. Uma correlação não significativa representa um coeficiente de correlação estatisticamente igual à zero, ou seja, não existe correlação entre as duas variáveis testadas. O valor-p do teste de associação linear encontra-se na Tabela 9.

De forma a melhor visualizar as relações existentes entre as variáveis foi feito um gráfico perceptual via Análise de Componentes Principais (GRAFICO 6). A quantidade de variação explicada pelas duas componentes principais foi de 69,42% (41,86% da primeira componente e 27,56% da segunda componente), o que indica que é possível obter uma boa interpretação da relação entre as variáveis interpretando o gráfico de duas dimensões da Análise de Componentes Principais.

Tabela 8- Matriz de correlação entre as variáveis analisadas

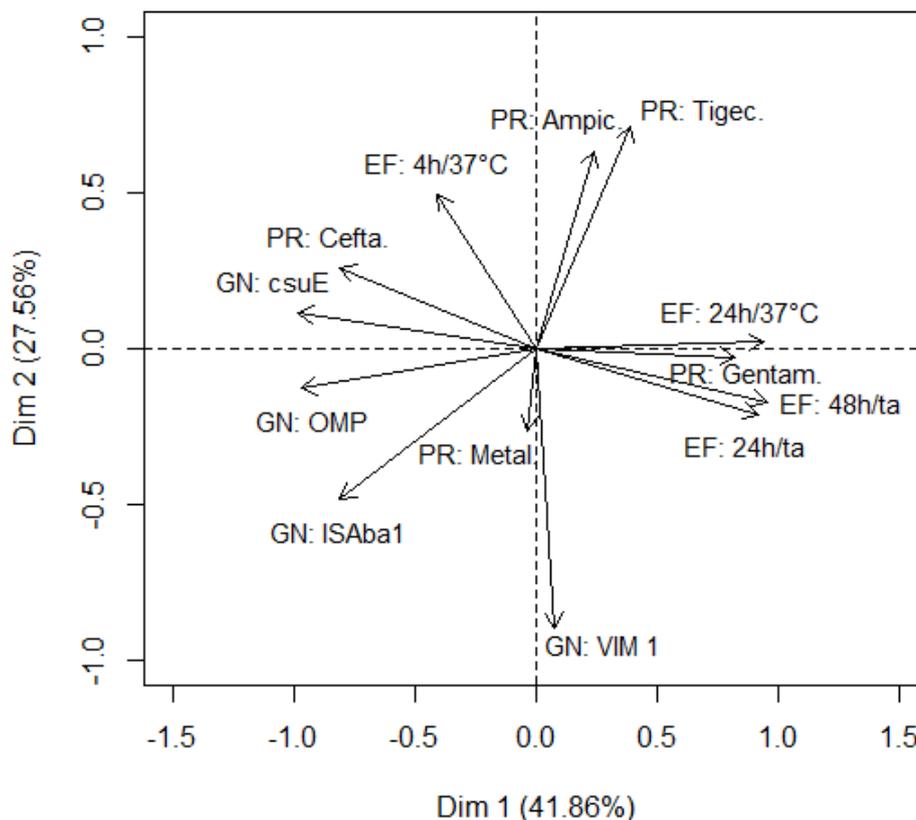
Variáveis	Genes				Ensaio Fenotípicos				Perfil de Resistência			
	VIM 1	ISAbal1	csuE	ompA	4h/37°C	24h/37°C	24h/25°C	48h/25°C	Ampic.	Gentam.	Cefta.	Tigec.
ISAbal1	0,31											
csuE	-0,10	0,47										
ompA	0,06	0,50	0,74									
4h/37°C	-0,38	0,04	0,38	0,11								
24h/37°C	0,00	-0,41	-0,52	-0,55	0,10							
24h/25°C	0,14	-0,12	-0,60	-0,52	0,03	0,61						
48h/25°C	0,19	-0,22	-0,63	-0,57	-0,12	0,58	0,60					
Ampic.	-0,05	-0,22	-0,11	-0,12	-0,03	0,02	-0,07	0,05				
Gentam.	-0,04	-0,35	-0,56	-0,38	-0,03	0,38	0,44	0,33	-0,06			
Cefta.	-0,12	0,15	0,63	0,41	0,32	-0,31	-0,23	-0,48	0,07	0,05		
Tigec.	-0,34	-0,29	-0,04	-0,32	-0,05	0,16	0,01	0,16	0,37	-0,04	0,06	
Metal.	0,27	0,12	0,09	0,22	0,05	0,23	0,19	0,18	-0,02	0,12	0,46	0,20

Tabela 9 - Valores-p obtidos pelo teste de associação linear

Variáveis	Genes				Ensaio Fenotípicos				Perfil de Resistência			
	VIM 1	ISAbal1	csuE	ompA	4h/37°C	24h/37°C	24h/25°C	48h/25°C	Ampic.	Gentam.	Cefta.	Tigec.
ISAbal1	0,232											
csuE	0,656	0,025										
ompA	0,825	0,061	0,000									
4h/37°C	0,015	0,970	0,008	0,572								
24h/37°C	0,959	0,005	0,000	0,000	0,458							
24h/25°C	0,692	0,218	0,000	0,001	0,848	0,000						
48h/25°C	0,624	0,043	0,000	0,001	0,191	0,000	0,000					
Ampic.	0,499	0,048	0,588	0,413	0,315	0,611	0,187	0,586				
Gentam.	0,887	0,192	0,001	0,050	0,796	0,004	0,002	0,007	0,753			
Cefta.	0,561	0,729	0,000	0,040	0,049	0,021	0,044	0,000	0,845	0,590		
Tigec.	0,074	0,221	0,926	0,087	0,843	0,422	0,713	0,342	0,014	0,887	0,786	
Metal.	0,410	0,564	0,717	0,483	0,979	0,259	0,839	0,982	0,174	0,244	0,114	0,474

Legenda das Tabelas 8 e 9: 4h/37°C, 24h/37°C, 24h/25°C, 48h/25°C: períodos de incubação dos ensaios de biofilme em microplaca de poliestireno. Ampic: Ampicilina, Gentam: Gentamicina, Cefta: Ceftazidime, Tigec: Tigeciclina, Metal: Expressão fenotípica de metalobetalactamases.

Gráfico 6 - Mapa perceptual via componentes principais para as variáveis.



No Gráfico 6 é possível observar algumas correlações interessantes com significância estatística, com base na análise da Tabela 8.

Percebe-se que a resistência à gentamicina correlaciona-se negativamente à presença do gene *csuE*. Observa-se então, uma tendência das amostras resistentes à gentamicina não carregarem o gene *csuE*, associado à formação de biofilme. Por outro lado, a resistência à gentamicina correlaciona-se positivamente às variáveis de formação de biofilme à 24h/37°C, 24h/25°C e 48h/25°C.

Já a presença do gene *ompA*, também associado à formação de biofilme, correlaciona-se negativamente à formação de biofilme por 24h/37°C, 24h/25°C e 48h/25°C. Interpreta-se, assim, que o gene *ompA* associa-se fracamente à formação de biofilme em períodos de incubação de 24 a 48h. O gene *ompA* correlacionou-se positivamente à variável de formação de biofilme em 4h/37°C, porém sem relevância estatística ($p > 0,05$). Verifica-se ainda que o gene *csuE* correlaciona-se positivamente com *ISAbal*. Portanto, amostras positivas para *ISAbal* tendem a apresentar o gene *csuE*.

Por fim, identifica-se que a resistência à tigeciclina correlaciona-se positivamente à resistência à ampicilina; ou seja, as amostras que apresentaram resistência á ampicilina apresentaram também à tigeciclina.

5.7 Perfil clínico e demográfico dos participantes do estudo

As amostras coletadas foram provenientes de 37 pacientes distintos, cuja média de idade foi 61,05 anos. Do total, 59,5% eram do sexo masculino e 40,5% residiam em Belo Horizonte. Adicionalmente, 67,6% dos participantes foram incluídos no estudo quando estiveram internados na UTI, sendo as secreções diversas obtida com o auxílio do *swab*, seguida de cultura bacteriológica, o exame predominante de identificação de *A.baumannii* para inclusão no estudo. Trinta e oito por cento dos pacientes tiveram internação hospitalar prévia nos 3 meses antecedentes à internação atual e 40,5% estiveram internados ao longo dos 12 meses anteriores. Nenhum paciente era institucionalizado ou havia feito uso de procedimentos invasivos em domicílio (TABELA 10).

Tabela 10 – Perfil demográfico dos pacientes acompanhados no estudo

n=37	Frequência	%
Sexo feminino	15	40,5
Masculino	22	59,5
Residência em Belo Horizonte	15	40,5
Local de inclusão		
Pronto Atendimento	01	2,7
Enfermaria	11	29,7
Unidade de Terapia Intensiva	25	67,6
Sítios pesquisados		
Secreções (obtidas com <i>Swab</i>)	15	40,5
Aspirado traqueal	9	24,3
Hemocultura	6	16,2
Ponta CVC	5	13,5
Urocultura	2	5,4
Internação prévia (últimos 03 meses)	14	37,8
Internação prévia (últimos 12 meses)	15	40,5

Os pacientes acompanhados fizeram uso de, em média, 3,62 esquemas de antibioticoterapia durante a internação, cuja duração média foi de 56,62 dias. Entre

o subgrupo de pacientes que foram admitidos em UTI, durante a internação, o valor médio do escore APACHE II foi de 12,73 e para o escore de falência orgânica SOFA o valor médio foi 3,11 (TABELA 11).

Tabela 11 – Perfil de gravidade dos pacientes acompanhados no estudo

	Idade (anos)	APACHE II	SOFA	Número de esquemas de antibioticoterapia	Tempo de internação total (dias)
Média	61,05	12,73	3,11	3,62	56,62
Mediana	60,8	12,0	3,00	3,00	48,00
Desvio- padrão	15,78	7,08	2,99	1,80	35,90
Mínimo	20	0	0	0	5,00
Máximo	85	28	10	8	138,00
Percentil 25	51,10	8,50	0	2,50	26,0
50	60,80	12,00	3,0	3,0	48,0
75	73,32	18,50	4,50	4,50	89,0

Todos os pacientes apresentavam algum tipo de comorbidade à internação, sendo diabetes mellitus (35,1%), insuficiência cardíaca congestiva (ICC; 29,7%) e insuficiência renal crônica (IRC; 21,6%) as mais prevalentes (TABELA 12).

Tabela 12 – Frequência das comorbidades apresentadas pelos pacientes avaliados no estudo

Comorbidades n=37	Frequência	%
Diabetes mellitus	13	35,1
Insulino-dependente	3	8,1
ICC	11	29,7
IRC	8	21,6
Imunossupressão	7	18,9
DPOC	6	16,2
Neoplasia – hematológica	5	13,5
Cirrose hepática	4	10,8
Neoplasia – órgão sólido	2	5,4
Acamado	2	5,4
AVE	1	2,7
Músculo-degenerativa	1	2,7
Úlcera por pressão	1	2,7

Durante a internação, 89,2% dos pacientes estiveram internados em UTI, sendo que 21,6% apresentaram duas internações em terapia intensiva em uma mesma

internação hospitalar. Nesse subgrupo, 97,3% fizeram uso de dispositivos invasivos, sendo 81,1% submetidos a ventilação mecânica, 67,6% ao uso de aminas vasoativas e 29,7% à hemodiálise (TABELA 13).

Tabela 13 – Perfil de internação em UTI dos pacientes acompanhados no estudo

Perfil de internação em UTI	Frequência	%
Internação em UTI	33	89,2
Número de vezes que esteve internado em UTI		
0	4	10,8
1	24	64,9
2	8	21,6
3	1	2,7
Uso de dispositivos invasivos	36	97,3
VM	30	81,1
TQT	11	29,7
Uso de aminas vasoativas	25	67,6
Em hemodiálise	11	29,7

Noventa e dois por cento dos pacientes desenvolveram critérios clínicos e laboratoriais de doença infecciosa durante internação, com a presença de sepse. *A.baumannii* foi considerado o agente em 45,9% dos quadros de sepse apresentados, sendo este micro-organismo suspeito de causa etiológica da sepse em 45,9% dos casos (TABELA 14).

Tabela 14 – Frequência de casos de doença infecciosa ou sepse por *A. baumannii* entre os pacientes acompanhados no estudo

Quadro clínico dos pacientes	Frequência	%
Doença infecciosa	34	91,9
Sepse presente	34	91,9
Sepse causada por <i>A.baumannii</i>		
Negativo	3	8,2
Suspeita	17	45,9
Confirmada	17	45,9

Quando o perfil fenotípico e genotípico das amostras foi analisado, 100% das amostras de *A.baumannii* identificadas nos 37 pacientes, foram positivas também para os genes *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51} e *bla*_{VIM-1}. Foram isoladas de 89,2% dos pacientes,

amostras portadoras do elemento de inserção *ISAbal*, 91,9% do gene *csuE* e 43,2% do gene *ompA* (TABELA 15).

Tabela 15 – Frequência dos genes de virulência e resistência pesquisados e expressão de metalobetalactamases em amostras de *A.baumannii* isoladas dos pacientes acompanhados no estudo

N=37	Frequência	%
<i>bla</i> _{OXA23}	37	100
<i>bla</i> _{OXA24}	0	0
<i>bla</i> _{OXA51}	37	100
<i>bla</i> _{OXA58}	0	0
<i>bla</i> _{OXA143}	0	0
<i>bla</i> _{VIM-1}	37	100
ISAbal	33	89,2
<i>csuE</i>	34	91,9
<i>ompA</i>	16	43,2
Metalobetalactamases (Etest®)	37	100

Em relação ao desfecho clínico dos pacientes correlacionados à presença de genes de virulência, percebemos na Tabela 16 que 32,4% daqueles que apresentaram somente o gene *csuE* evoluíram para óbito. Já para aqueles nos quais foi identificado somente o gene *ompA*, este valor foi de 50%. Ao avaliar a presença concomitante de ambos os genes, identificamos 50% de mortalidade. No entanto as diferenças apresentadas entre a presença dos genes e a mortalidade atribuída não foram estatisticamente significativas.

Tabela 16 – Associação entre a presença de genes de virulência de *A.baumannii* e o desfecho clínico (alta, transferências ou óbito) dos pacientes estudados

Genes associados à virulência em <i>A.baumannii</i>		Óbito (%)	Valor-p
<i>csuE</i>	Negativo	1 (33,3%)	1,00
	Positivo	11 (32,4%)	
<i>ompA</i>	Negativo	4 (19%)	0,07
	Positivo	8 (50%)	
<i>csuE</i> e/ou <i>ompA</i>	Negativo	4 (20%)	0,08
	Positivo	8 (50%)	

O tempo de internação total foi, de 62,0 dias para os pacientes que receberam alta hospitalar ou foram transferidos para outras instituições e de 39,0 dias para aqueles pacientes que evoluíram para o óbito (TABELA 17).

Tabela 17 – Tempo de internação total dos pacientes acompanhados no estudo

Tempo de internação total (dias)			
Alta ou transferência n= 25	Média	65,04	
	Mediana	62,00	
	Desvio-padrão	37,18	
	Mínimo	11,0	
	Máximo	138,0	
	Percentil	25	30,0
		50	62,0
75		96,0	
Óbito n=12	Média	39,08	
	Mediana	39,00	
	Desvio-padrão	26,56	
	Mínimo	5,00	
	Máximo	89,00	
	Percentil	25	15,25
		50	39,00
75		55,75	

Em relação à interferência da presença dos genes associados à virulência de *A.baumannii* no tempo de internação, aqueles pacientes positivos somente para *ompA* apresentaram tempo médio de internação menor (mediana de 42 dias) quando comparados àqueles com presença de *csuE* (mediana de 46,0 dias). Quando foi feita a análise da associação de ambos os genes com o tempo de internação, verificou-se uma mediana de internação de 42,0 dias, sem significância estatística (TABELA 18).

Tabela 18 – Análise da interferência da presença ou ausência de genes de virulência de *A.baumannii* no tempo médio de internação dos pacientes acompanhados no estudo

Genes de virulência		Mediana do tempo de internação (dias)
<i>ompA</i>	Negativo	68,0
	Positivo	42,0
<i>csuE</i>	Negativo	110,0
	Positivo	46,0
<i>ompA + csuE</i>	Negativo	65,0
	Positivo	42,0

Ao associar a presença de doença infecciosa com a presença de genes de virulência em *A.baumannii* verificou-se que 91,2% dos pacientes que apresentaram *csuE* e 38,2% dos daqueles com presença de *ompA* ($p=0.072$) desenvolveram doença infecciosa pelo micro-organismo. Já quando foi feita a análise de *ompA* e *csuE*, concomitantemente, identificou-se que 39,4% dos pacientes desenvolveram doença infecciosa ($p=0.072$) (TABELA 19).

Tabela 19 – Associação entre a presença de genes de virulência de *A.baumannii* e a ocorrência de doença infecciosa nos pacientes estudados

Genes de virulência		Doença Infecciosa (Frequência/ %)		% do Total	Valor-p
		Não	Sim		
<i>csuE</i>	Negativo	0	3 (8,8%)	3 (8,1%)	1,00
	Positivo	3 (100%)	31 (91,2%)		
<i>ompA</i>	Negativo	0	21 (61,8%)	21 (56,8%)	0,07
	Positivo	3 (100%)	13 (38,2%)		
<i>csuE + ompA</i>	Negativo	0	20 (60,6%)	20 (55,6%)	0,07
	Positivo	3 (100%)	13 (39,4%)		

5.8 Caracterização do perfil genético das amostras

As reações de amplificação do DNA dos 62 amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas dos 37 pacientes mostrou de um a oito fragmentos por amostras conforme demonstrado na Tabela 20. A Figura 9 mostra o resultado do agrupamento dos perfis de bandas das amostras analisadas obtidas pela PCR. Para a análise de compartilhamento de bandas, foram consideradas as bandas numa faixa aproximada entre 200 e 1600 pares de base (pb). A matriz do coeficiente de similaridade de DICE gerou um dendrograma obtido por UPGMA mostrando que estas pertencem a três clados distintos, A, B e C. Das 62 amostras amplificadas, 33 (53.2%) foram agrupados no clado A, 21 (33,9%) no B e 8 (12,9%) no clado C. No perfil A, os fragmentos variaram entre 250 a 1600pb, no perfil B, a variação da massa molecular dos fragmentos foi de 200 a 1600 pb e no perfil C de 250 a 1500pb.

A Tabela 20, utilizada para gerar a matriz para a construção do dendrograma (FIGURA 8) pelo programa NTSYS, mostra que dentre as amostras avaliadas, algumas apresentam perfis idênticos entre si, tais como: (i) amostras 15,16, 18 e 19 com

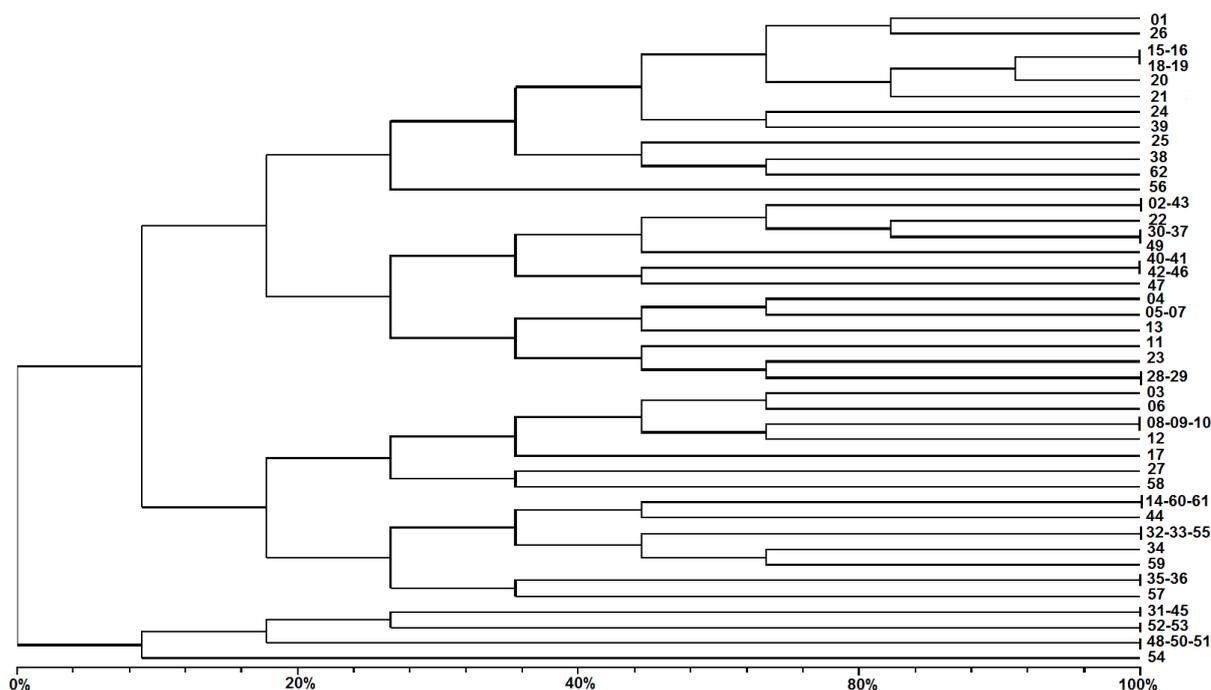
fragmentos de 250, 300,550,600,650,900,950,1500 pb; (ii) amostras 02 e 43, com fragmentos de 300,950,1500pb; (iii) amostras 30 e 37, com fragmentos de 250,300,950,1500pb; (iv) amostras 40,41,42 e 46, com fragmentos de 250,300,750,950,1500pb; (v) amostras 05 e 07, com fragmentos de 300,600,750,950,1500pb. Estes perfis estão localizados no primeiro ramo do dendrograma, ou seja, no clado A. Outros agrupamentos genotípicos de amostras com idênticos perfis estão mostrados no clado B, tais como: (vi) amostras 08,09 e 10 com fragmentos de 300, 600, 750, 950,1080pb; (vii) amostras 14, 60 e 61, com perfis de 250,300,1500pb;(viii) isolados 32, 33 e 55, com fragmentos de 300,1000,1500pb e (ix) amostras 35 e 36, com fragmentos de 300,600,1500pb. No clado C é possível verificar também isolados com idênticos perfis de bandas, tais como: (x) amostras 31 e 45, com fragmentos de 250, 300, 750, 1000,1500pb; (xi) amostras 52 e 53, com fragmentos de 250,300,750,1000,1500pb e (xii) amostras 48, 50 e 51, com fragmentos de 250,300,650, 750,950,1080pb.

Tabela 20 – Perfil genético das amostras analisadas por ERIC-PCR e tamanho das bandas relacionadas.

Amostras ERIC	Perfil	Tamanho das bandas (pb)
1	A	250, 300, 550,900,950, 1500
2	A	300,950,1500
3	B	300,750,900,950,1080,1600,
4	A	600,750,950,1600
5	A	300,600,750,950,1500
6	B	300,750,900,950,1080
7	A	300,600,750,950,1500
8	B	300,600,750,950,1080
9	B	300,600,750,950,1080
10	B	300,600,750,950,1080
11	A	250,300,600,750,950,1080,1500
12	B	300,600,750,1080
13	A	300,600,750,950,1000,1500
14	B	250,300,1500
15	A	250,300,550,600,650,900,950,1500
16	A	250,300,550,600,650,900,950,1500
17	B	250,300, 600,750,900
18	A	250,300,550,600,650,900,950,1500
19	A	250,300,550,600,650,900,950,1500
20	A	300,550,600,650,900,950,1500
21	A	250,300,550,650,900,950,1080,1500
22	A	250,300,900,950,1500,
23	A	300,650,950,1080,1500,1600

24	A	250,300,350,480,550,950,1500
25	A	300,550,600,950,1500 correto
26	A	300,550,900,950,1500
27	B	200,300,1080
28	A	300,600,950,1080,1500
29	A	300,600,950,1080,1500
30	A	250,300,950,1500
31	C	250,300,750,1000,1500
32	B	300,1000,1500
33	B	300,1000,1500
34	B	1500
35	B	300,600,1500
36	B	300,600,1500
37	A	250,300,950,1500
38	A	300,550,600,900,1080
39	A	250,300,350,550,1500
40	A	250,300,750,950,1500
41	A	250,300,750,950,1500
42	A	250,300,750,950,1500
43	A	300,950,1500
44	B	250, 300,1500
45	C	250,300,750,1000,1500
46	A	250,300,750,950,1500
47	A	250,300,700,750,950,1500
48	C	250,300,650, 750,950,1080,
49	A	250,300,700, 750,900,950,1500
50	C	250,300,650, 750,950,1080,
51	C	250,300,650, 750,950,1080,
52	C	250,300,750,1000,1500
53	C	250,300,750,1000,1500
54	C	250,300,550,600,750,1000,1500
55	B	300,1000,1500
56	A	250,300,550,600,750,950,1500
57	B	250,300,600,1500
58	B	300
59	B	300,1500
60	B	250,300,1500
61	B	250,300,1500
62	A	300,550,600,1500

Figura 9 - Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE mostrando as relações entre as amostras de *A.baumannii* avaliadas



Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

Das amostras clínicas caracterizadas em um mesmo clado, consideradas idênticas, como as de números 15,16,18 e 19, são pertencentes a 03 pacientes diferentes, sendo as amostras 15 e 16 de um mesmo paciente. A amostra 15 foi coletada com auxílio de um swab perianal, indicando colonização, e a 16 foi proveniente de um aspirado traqueal, associado a doença infecciosa no paciente. Tais amostras apresentaram perfil genotípico idêntico para os genes pesquisados, e para os ensaios fenotípicos de formação de biofilme, assim como para os resultados de antibiograma pelo Etest®, sendo ambas resistentes à ampicilina-sulbactam, ceftazidime e meropenem, com sensibilidade intermediária a tigeciclina e sensibilidade à polimixina. Já as outras amostras contidas no mesmo clado, 18 e 19, pertencem a dois pacientes distintos, sendo ambas identificadas em hemoculturas. Estas amostras diferiram entre si nos resultados de pesquisa dos genes *bla_{VIM}*, *csuE* e *ompA*, no status de formação de biofilme avaliado fenotipicamente e em alguns aspectos do antibiograma. As amostras 15 e 16 foram positivas para a presença dos genes *ompA* e *csuE*, enquanto 18 e 19 foram negativas. A amostra 18 foi uma boa formadora de biofilme em placa de poliestireno, alcançando (+++) em todos os períodos e temperaturas de incubação, enquanto as amostras 15 e 16 se mostraram moderadas ou fracas produtoras. A amostra 19 foi fraca produtora de biofilme por 4h a 37°C, mas progrediu a adesão com o aumento do tempo de incubação.

O perfil de resistência visto através do antibiograma também foi diferente para as amostras 18 e 19 quando comparadas à 15 e 16.

As amostras 02 e 43 foram isoladas de pacientes também distintos. A amostra 02 foi coletada com *swab* perianal e a 43 de ponta de cateter central. Ambas apresentaram perfis genéticos idênticos, mas divergiram quando comparadas nos experimentos de formação de biofilme. A amostra 02 apresentou pior capacidade de formação de biofilme, alcançando (++++) somente à 25°C por 48h. Esta amostra ainda se mostrou sensível a gentamicina, ceftazidime e tigeciclina pelo Etest®, diferente da amostra 43.

As amostras 30 e 37 pertencem a pacientes distintos, isoladas de *swab* perianal e ponta de cateter central, respectivamente. A amostra 37 foi negativa para presença dos genes *ISAbal1* e *csuE*, sendo melhor formadora de biofilme que a número 30. O antibiograma também foi alterado, sendo a amostra 37 resistente a ampicilina-sulbactam e tigeciclina, ao contrário da amostra 30.

As amostras 08, 09 e 10, pertencentes a um mesmo clado, foram recuperadas de 02 pacientes distintos, sendo a 08 e a 09 isoladas de um mesmo paciente, ambas em hemocultura. Tais amostras diferem somente quanto a presença do gene *bla_{VIM}* e à expressão fenotípica de metalobetalactamase pelo Etest®, sendo a amostra 08 negativa para ambos.

Todas as outras amostras pertencentes a um mesmo clado foram isoladas de pacientes distintos, e apresentaram diferentes resultados quanto à identificação dos genes pesquisados e ensaios fenotípicos, como exposto nos Anexos Ea e Eb.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo empregaram-se, com sucesso, ensaios de PCR e ERIC-PCR com iniciadores específicos para a identificação e caracterização do perfil genético das 62 amostras de *Acinetobacter baumannii* isolados de 37 pacientes colonizados e portadores de diferentes doenças infecciosas.

Vários estudos utilizam ERIC-PCR para a identificação de similaridade genotípica entre as amostras em estudo. Zong e Zhang (2013) determinaram a clonalidade de amostras de *A. johnsonii* carreadoras de *bla*_{NDM-1}, recuperadas de esgoto hospitalar na China, através de ERIC-PCR. As amostras apresentaram perfis de bandas diferentes, não sendo tendo associação clonal. Neste sentido, Durmaz *et al.* (2015), avaliaram a disseminação de β -lactamases de amostras de *Escherichia coli*, por ERIC-PCR, e demonstraram a existência de 5 a 6 grupos clonais para as 42 amostras analisadas na Turquia. Li *et al.* (2015), identificaram os clones de *A. baumannii* XDR presentes em um hospital universitário de Shanghai, empregando-se ERIC-PCR e MLST. Não houve diferença significativa entre as duas metodologias utilizadas e as 106 amostras foram agrupadas em apenas dois grupos, quando avaliadas por similaridade genética. Martins *et al.* (2014), avaliaram a disseminação clonal de 55 amostras clínicas de *A. baumannii* MDR em 05 hospitais de Belo Horizonte também por ERIC-PCR, com os mesmos iniciadores utilizados no presente estudo. As amostras analisadas por Martins *et al.* (2014), foram segregadas em 04 grupos clonais distintos, de acordo com a similaridade genética caracterizada pelo coeficiente DICE, sugerindo-se que o mesmo clone está presente entre os hospitais participantes do estudo. Além disso, indicou-se que estas amostras podem ser disseminadas por diferentes vias, como os profissionais de saúde e a transferência dos pacientes entre os hospitais e entre os setores de uma mesma instituição.

A concordância e o nível de discriminação oferecido pelo ERIC-PCR, quando comparado ao *multilocus sequence typing* (MLST) é relativamente alto, e valida a identificação clonal das amostras por ERIC-PCR. (KIDD *et al.*, 2011). Sendo assim, o ERIC-PCR se consolida como uma ferramenta de caracterização de perfil genético bastante utilizada, com custo acessível e resultados significativos.

Acinetobacter spp. raramente causa doenças infecciosas em hospedeiros saudáveis. Ogutlu *et.al* (2014) conduziram um estudo sobre o consumo de

carbapenêmicos e o número de pacientes com *A.baumannii* MDR hospitalizados em UTI entre 2011 e 2013. Um total de 1822 pacientes foram avaliados e divididos quanto à restrição ao uso de carbapenêmicos, em um determinado período. O grupo de pacientes cujo uso de carbapenêmicos foi irrestrito apresentou maior incidência de doença infecciosa causada por *A.baumannii* MDR, quando comparado ao grupo no qual o uso desta classe de antimicrobianos foi restrita.

Espécies de *Acinetobacter* são responsáveis por 8,4% das pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) e 2,2% das doenças infecciosas da corrente sanguínea nos Estados Unidos. A resistência à carbapenêmicos está presente em 65% das PAV por *A.baumannii* nos Estados Unidos e Europa (FARRELL *et al.*, 2014; ZARRILLI *et.al.*, 2013; KIM *et.al.*, 2013). Estudo de Kim *et al* (2013), mostrou que >60% de todos *A.baumannii* isolados como agentes de pneumonia relacionadas à assistência à saúde na Ásia, eram resistentes a carbapenêmicos.

No presente estudo foram identificados altos índice de amostras resistentes aos carbapenêmicos, fato que pode ser explicado pelo uso constante de carbapenêmicos nos esquemas antibacterianos adotados na instituição participante. A prevalência de doenças infecciosas causadas por *A.baumannii* pode ser reduzida pela implementação e execução de medidas de controle e de uma política de uso de antimicrobianos. Uma taxa de resistência a carbapenêmicos de 77% por *A.baumannii* foi relatada na Turquia em 2012 (UHESA, 2012). A prevalência de linhagens resistentes de *Acinetobacter* é alta e, países como Grécia, Turquia e Grécia, onde carbapenêmicos são largamente utilizados, sendo a prevalência menor em países como Holanda e nos países da Escandinávia, que adotam políticas restritivas no uso de antimicrobianos (ADRIAENSSENS *et al.*, 2011). Nossos dados corroboram com a literatura, uma vez que 98,4% de nossas amostras foram resistentes ao meropenem. No contexto epidemiológico brasileiro, Neves *et al.* (2012) identificaram 58,1% de resistência ao imipenem no mesmo hospital onde nosso estudo foi realizado. Em estudo de Fonseca *et. al* (2013), que investigou o perfil de resistência de amostras de *A.baumannii* provenientes de vários estados brasileiros, todas as amostras analisadas foram resistentes a meropenem. Observou-se uma discrepância significativa entre as amostras do Rio de Janeiro e do Maranhão: 23% das amostras vindas do Rio de Janeiro foram resistentes a imipenem *versus* 86,6% das provenientes do Maranhão. No estudo de Fonseca *et al.* (2013), assim como no presente

estudo, obtivemos alta porcentagem de presença dos genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51} e *ISAbal*, que estão envolvidos na resistência à carbapenêmicos.

O conceito de uso racional de antimicrobianos a fim de evitar o surgimento e propagação da resistência em *Acinetobacter* é demonstrado em um estudo realizado por Poirel e Nordmann (2006), em que o gene responsável pela codificação de oxacilinas é perdido na ausência de pressão seletiva de antimicrobianos. Neste sentido, se o uso de antimicrobianos for evitado ou minimizado, linhagens resistentes de *A.baumannii* podem reverter sua condição para fenótipos mais susceptíveis (POGUE *et al.*, 2013). Cisneros e Rodriguez-Bano (2002) demonstraram que a multirresistência em *A.baumannii* muitas vezes resulta de contaminações sucessivas com diferentes clones em uma determinada unidade hospitalar, em vez de um aumento da resistência por etapas sucessivas em um único clone. A pressão seletiva antimicrobiana pode selecionar uma cepa resistente de *Acinetobacter* e pode desempenhar um papel importante na propagação de resistência a antimicrobianos.

A investigação dos desfechos de pacientes com doenças infecciosas sistêmicas por *A.baumannii* MDR é geralmente pobre por diversas razões. É importante notar que *A. baumannii* é muitas vezes um patógeno oportunista, causando doenças como pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes debilitados. Assim, embora as taxas de falha terapêutica e as taxas de mortalidade sejam elevadas, é extremamente difícil definir a mortalidade que é atribuível à doença infecciosa. Além disso, quando se compara o tratamento de um clone resistente com o tratamento de uma amostra mais sensível, existem muitos fatores que interferem no resultado. Por exemplo, pessoas com *A.baumannii* MDR podem ser mais propensas a ter comorbidades subjacentes, instalação de cateteres, atrasos nos horários de terapia antimicrobiana adequada, bem como uma variedade de outras doenças infecciosas causadas por outros agentes patogênicos, concomitantemente à exposição aos antimicrobianos (POGUE *et.al*, 2013).

As opções terapêuticas são extremamente limitadas para doenças infecciosas associadas a *A.baumannii* MDR. β -lactâmicos, fluoroquinolonas e sulfonamidas normalmente não têm atividade contra *A.baumannii* MDR, e, como resultado, os principais pilares da terapia tipicamente consistem de terapias com a farmacocinética relativamente tóxica, com diversas limitações. Dentre os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *A.baumannii* temos a

polimixina, cujo uso é restrito devido às altas taxas de nefrotoxicidade associada. Embora reversível, é o evento adverso mais comum e grave relacionado ao seu uso (POGUE *et al.*, 2011). A polimixina é administrada na forma de pró-droga inativa, o que pode ser a causa de hetero-resistência. Um estudo recente avaliou o tratamento de doenças infecciosas por *A.baumannii* com ampicilina-sulbactam e polimixina em 28 pacientes com PAV. O sucesso clínico e bacteriológico do tratamento foi similar entre os dois grupos (BETROSIAN *et al.*, 2008). Chan *et al.* (2010), demonstraram a eficácia do tratamento com polimixina em 67% dos pacientes, comparados com 78, 81 e 90% de eficácia entre pacientes tratados com aminoglicosídeos, minociclina e tigeciclina, respectivamente. O presente estudo reflete uma situação epidemiológica favorável ao uso de polimixina, uma vez que nenhuma das 62 amostras analisadas se mostrou resistente à polimixina pelo método ETest®.

Já a tigeciclina, derivada da minociclina, é uma gliciliciclina bacteriostática. Seu mecanismo de ação ocorre via inibição de síntese protéica através de ligação à subunidade ribossomal 30S, o que previne a incorporação de aminoácidos na cadeia peptídica. Tigeciclina exibe atividade de largo espectro contra bactérias Gram positivo e Gram negativo, como *Staphylococcus aureus* MRSA e *A.baumannii* MDR. Atividade significativa *in vitro* contra *A.baumannii* tem sido relatada para tigeciclina. Em um estudo com 5127 isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de 32 países, tigeciclina inibiu 97% de todos os isolados coletados (MENDES *et al.*, 2010). Em outro estudo, sobre tendências para a susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos, realizado entre 2005 e 2009, tigeciclina foi um dos antimicrobianos que apresentou boa atividade *in vitro*, dentre 10.149 amostras de *A.baumannii* testadas. (MORFIN-OTERO *et al.*, 2012). Tigeciclina é uma molécula extremamente lipofílica com um volume de distribuição de 7-9l/kg. Enquanto garante excelente penetração tecidual para doenças infecciosas intra-abdominais e cutâneas, alcança uma concentração sub-ótima para o tratamento de bacteremias. Além disso, esta droga não é excretada via renal, o que não é ideal para o tratamento de doenças infecciosas urinárias. Sendo assim, há uma preocupação a cerca do uso de tigeciclina contra doenças infecciosas sistêmicas causadas por *A.baumannii* MDR, como PAV e doenças infecciosas da corrente sanguínea (POGUE *et al.*, 2013). Peleg *et al.* (2007) descreveram o desenvolvimento de bacteremia por uma amostra não-susceptível de *A.baumannii*, em partes devido a sua baixa concentração sérica.

Sun *et al.* (2013) encontrou aumento da falência terapêutica e altas taxas de choque séptico comparados com outros antimicrobianos. Apesar das falhas de tratamento poder ser atribuídas a diversas causas, a resistência a tigeciclina deve ser considerada como uma delas. Dois relatos na Tailândia e Líbano apresentaram taxas de resistência inferiores a 3% (SUN *et al.*, 2013). Um estudo em Israel apresentou a maior taxa (78%) (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2007).

Na Europa, estudos realizados na Itália reportaram altas taxas de resistência (27,5%) em 2008 e (50%) em 2009 (RICCIARDI *et al.*, 2009.; CAPONE *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2013). Na América do Norte, Spellberg e Bonomo (2014) relataram 23% de resistência das amostras de *A.baumannii* a tigeciclina. A resistência a tigeciclina parece estar associada a transportadores de efluxo do tipo RND (SUN *et al.*, 2013). No nosso estudo, observou-se 48,4% de resistência à tigeciclina e 33,9% das amostras apresentaram resistência intermediária, baseado nos parâmetros da BSAC, assim indicados pelo EUCAST, uma vez que o CLSI ainda não estabeleceu um ponto de corte para sua padronização. Como descrito acima, o uso de tigeciclina para tratamento de doenças infecciosas sistêmicas não é largamente recomendado, sendo sua utilização inferior aos demais antimicrobianos. Mesmo assim, nota-se uma tendência de resistência elevada a um antimicrobiano que é pouco utilizado, representando um cenário epidemiológico preocupante.

Os aminoglicosídeos, especificamente tobramicina, gentamicina e amicacina, tem sido usados para o tratamento de doenças infecciosas por *A.baumannii* MDR, geralmente em combinação com outros antimicrobianos. O principal mecanismo de ação desta classe é através da interferência com a síntese protéica bacteriana por meio da ligação à subunidade ribossomal 30S. Dados sobre o uso de aminoglicosídeos contra *A.baumannii* MDR são limitados e se assemelham àqueles apresentados para polimixina (BLAIR *et al.*, 2015). Identificamos 67,7% de sensibilidade à gentamicina nas amostras clínicas analisadas. Martins *et al.* (2014) identificaram alta taxa de resistência à gentamicina (84,3%) por *A.baumannii* em 05 hospitais de Belo Horizonte, incidência maior que a encontrada no nosso estudo. Porém não foi foco da nossa pesquisa avaliar a relação entre o uso de antimicrobianos e a disseminação de resistência. Como já dito anteriormente, a pressão seletiva de antimicrobianos desempenha papel importante no desenvolvimento de resistência pelo micro-organismo e o uso irracional de

antimicrobianos é fator de risco para o aparecimento de altas taxas de resistência. Sendo assim, seria necessário avaliar a política de utilização de antimicrobianos na instituição e o consumo de gentamicina no período para obter dados mais concisos sobre a resistência apresentada por *A.baumannii* à gentamicina. Além disso, seria interessante extrapolar a pesquisa fenotípica para a investigação molecular de mecanismos de resistência.

A emergência de *A.baumannii* MDR é um grande desafio em pacientes hospitalizados. Chan *et al.* (2014) investigaram as IRAS causadas por *A.baumannii* em Taipei, de 2008 a 2010. Os micro-organismos foram recuperados de hemocultura, urocultura, trato respiratório, ferida cirúrgica e sistema cardiovascular. Todas as amostras foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, exceto colistina (polimixina E). As amostras foram geneticamente diversas e a maioria carregavam os genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51}. Posteriormente realizaram um estudo caso-controle (25 casos *A.baumannii* XDR para 100 controles) e evidenciou-se que mesmo na ausência de disseminação clonal *A.baumannii* XDR pode emergir sob pressão seletiva de antimicrobianos de largo espectro e, conseqüentemente, causar IRAS em hospedeiros imunocomprometidos.

Principe *et al.* (2014) investigaram a prevalência de amostras de *A.baumannii* isoladas na Itália e caracterizou o perfil de resistência dessas amostras com o escopo genético apresentado. Foram identificadas 508 amostras de *A.baumannii* em pacientes internados e 63 em pacientes externos. A maioria das amostras foram resistentes a múltiplos antimicrobianos, sendo sensíveis a polimixina. A carbapenemase *bla*_{OXA23} foi a mais comum, sendo encontrada em 81,7% das amostras analisadas, seguidas pela oxacilinase *bla*_{OXA58} (4,5%). Em 06 casos o micro-organismo carregava *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA58} concomitantemente. No geral, nossos resultados corroboram com os dados apresentados na literatura, perante a disseminação global de *bla*_{OXA23} e alertam para prevalência deste gene no Brasil. No presente estudo, 100% das amostras analisadas foram positivas para o gene *bla*_{OXA23}, seguido por *bla*_{VIM-1} (83,9%) e ISAb1 (90,32%). Nenhuma amostra apresentou resultados positivos para os genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{OXA143}. Martins *et al.* (2014) identificaram resultados semelhantes em Belo Horizonte, com positividade de 92,1% para o gene *bla*_{VIM-1} e 93,7% para *bla*_{OXA23}. Os resultados da pesquisa molecular de *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58} também foram negativos. Já Neves *et al.* (2012), em estudo realizado no mesmo hospital do presente trabalho

identificou a presença do gene *bla*_{OXA143} em 18,6% das amostras estudadas, resultado diferente do encontrado em nosso estudo, provavelmente devido a variação clonal das espécies ao longo dos anos.

Em estudo de Nordmann *et al.* (2011), 274 amostras de *A.baumannii* de 80 instituições distribuídas em 16 países, incluindo 14 países da Europa no período entre 2008-2009 apresentaram taxas de 47,1% de resistência a carbapenêmicos, com índices ainda maiores na Turquia, Grécia, Itália, Espanha e Inglaterra quando comparados à França, Alemanha e Suécia. Diferentemente do perfil brasileiro, a carbapenemase *bla*_{OXA58} foi a mais frequentemente identificada em surtos de *A.baumannii* na Europa, seguida por *bla*_{OXA23}. Métodos de epidemiologia molecular tem demonstrado que *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA51} são mais comuns nos EUA, baseado em 65 amostras resistentes recuperadas em Nova York, Pensilvânia, Flórida, Missouri, Nevada e Califórnia (ADAMS-HADUCH *et al.*, 2011). Segundo Mendes *et al.* (2009), a distribuição de genes do tipo OXA entre *Acinetobacter* spp. na Ásia é composta principalmente pela carbapenemase OXA-23, enquanto OXA-24/40 e OXA-58 são menos comuns.

Os elementos de inserção (IS) são importantes transportadores de alterações no genoma de *A.baumannii* e outros patógenos, como demonstrado pelos papéis que desempenham na mobilização de genes de resistência a antimicrobianos, modulação da expressão gênica e mediação de deleções genéticas e outros (TOUCHON *et al.*, 2014).

Os elementos IS também demonstraram estarem implicados na resistência a antimicrobianos. Mais notadamente, *ISAbal* fornece um promotor que permite a expressão de genes carbapenemases *downstream* (TURTON *et al.* 2006). Segundo Touchon *et al.* (2014), IS são muito diversos em tipo e abundância no gênero *Acinetobacter*, mesmo quando comparado à linhagens relacionadas. Tais autores identificaram ao menos uma cópia de *ISAbal* em 36% de todos os genomas de *Acinetobacter* analisados e ao menos 10 cópias em 10% destes, sugerindo um importante papel deste tipo de IS no gênero.

No presente estudo encontramos 90,3% de positividade para a presença de *ISAbal*, sendo que este esteve *upstream* a *bla*_{OXA51} e *bla*_{OXA23} em 88,7% das amostras. Interessante ressaltar que na única amostra em que *bla*_{OXA23} esteve ausente, houve sensibilidade ao meropenem pelo método de Etest®.

Sun *et al.* (2012) relatam que a superexpressão da bomba de efluxo AdeABC estimulada continuamente pelo sistema de dois componentes AdeRS foi encontrada como fator indutor de resistência a antimicrobianos, mesmo à tigeciclina em *A.baumannii* MDR. Apesar da sequência de inserção IS*Aba1* contribuir para uma das mutações em AdeRS, o mecanismo detalhado ainda não está claro. Pagano *et al.* (2013), investigaram os potenciais mecanismos contribuintes para a resistência a antimicrobianos em 58 amostras clínicas de *A.baumannii* em Porto Alegre. IS*Aba1* foi encontrado upstream ao gene *bla*_{OXA23-like} somente nas amostras resistentes a carbapenêmicos e esteve presente upstream a *bla*_{OXA51-like} tanto em amostras susceptíveis ou resistentes. Tais autores sugerem ainda que IS*Aba1*/*bla*_{OXA51} sozinhos seja insuficiente para conferir resistência a carbapenêmicos. Nossos dados corroboram com tal afirmação, uma vez que também identificamos perfil de sensibilidade a carbapenêmicos na amostra que apresentou IS*Aba1*/*bla*_{OXA51}. Porém, estudos com uma amostragem maior deste perfil genotípico deve ser realizado para a construção de uma análise mais refinada, com significância estatística.

Um dos principais fatores para a disseminação de *A.baumannii* em instituições de assistência à saúde é sua persistência em superfícies abióticas. Um dos mecanismos que propiciam seu desenvolvimento em hospitais é a presença do gene *csuE*, envolvido na formação de pili e de biofilme, largamente conservado em *A.baumannii*. A presença deste gene está associado a persistência de *A.baumannii* em dispositivos plásticos e de vidro (SAHL *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que a formação de pili para adesão às superfícies e formação de biofilme por *A.baumannii* depende da expressão do gene *csuE*. A inativação de *csuE* interrompe a produção de pili e a formação de biofilme sugerindo que a formação de pili mediada por CsuA/BABCDE tem papel relevante na armação do biofilme. A expressão de *csuE* é controlada por um sistema de dois componentes contendo um sensor quinase codificado por *bfmS* e um regulador de resposta codificado por *bfmR*. A inativação do sensor quinase não abole a formação de biofilme, porém, a inativação de *bfmR* resulta na perda de expressão do operon *csu* e, conseqüentemente, na abolição da produção de pili e formação de biofilme. Sugere-se então, que a expressão de um gene responsável pela formação de biofilme em *A.baumannii* seja controlado pelo sistema *bfmRS* (TOMARAS *et al.*, 2008).

Sendo assim, a modulação de *bfmS* no nível cromossomal ou expresso fenotipicamente pode diferir entre as diversas amostras. Além disso, uma proteína homóloga à proteína associada à formação de biofilme em *Staphylococcus* (Bap) e *quorum sensing* estão envolvidos na formação de biofilme por *A.baumannii*. Similarmente, a aderência de *A.baumannii* às células humanas epiteliais podem contribuir para os passos iniciais de colonização em superfícies abióticas, a qual pode ser aumentada pela expressão do gene *bla_{PER-1}*, também associado à formação de biofilme (McCONNELL *et al.*, 2013).

É interessante ressaltar que *bla_{PER-1}* codifica resistência a antimicrobianos β -lactâmicos em Gram negativo (FALLAH *et al.*, 2014) e estudos como o de Dong *et al.* (2013) tem tentado investigar a associação entre o perfil de resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme por *A.baumannii*. Tais autores avaliaram a presença de *csuC*, *csuD*, *csuE*, *ompA*, *bla_{PER-1}* e *aba1* em 72 amostras clínicas de *A.baumannii*. Como resultado, identificaram alta prevalência (>80%) de *csuC*, *csuD*, *csuE*, *bla_{PER-1}* e *aba1*. Porém, não foram realizados ensaios fenotípicos para avaliação da formação de biofilme para a correlação da expressão de tais genes. Já Azizi *et al.* (2015) investigaram a associação entre a presença de oxacilinases e a formação de biofilme em microplacas de poliestireno por amostras de *A.baumannii* e identificaram que amostras positivas para *bla_{OXA51}* e *bla_{OXA23}*, concomitantemente, mas negativas para *bla_{OXA24/40}* formaram biofilmes fracamente aderentes ou não apresentaram aderência em microplacas de poliestireno.

No nosso estudo, a presença do gene *csuE* correlacionou-se positivamente com a presença de *ISAbal* e negativamente à expressão fenotípica de resistência a gentamicina ($p < 0.05$). Porém, a resistência à gentamicina correlacionou-se positivamente às variáveis de formação de biofilme à 24h/37°C, 24h/25°C e 48h/25°C ($p < 0.05$). Sendo assim, é possível afirmar, a partir destas análises estatísticas, que amostras resistentes à gentamicina estão associadas à formação de biofilmes em 24 a 48h, tanto a 25°C quanto a 37°C, sugerindo a expressão de outros genes associados à formação de biofilme, diferentes de *csuE*. Verificou-se ainda que o gene *csuE* correlacionou-se positivamente com *ISAbal*. Portanto, amostras positivas para *ISAbal* tendem a apresentar o gene *csuE*. Apesar das variáveis diversas que interferem na expressão de *csuE* e *ISAbal*,

podemos inferir que amostras carreadoras de *ISAbal* podem ser, além de resistentes a certos antimicrobianos, como ampicilina, mais virulentas, por associarem-se positivamente à presença do gene *csuE*.

Todas as amostras negativas para a presença do gene *csuE* em nossa pesquisa, apresentaram formação de biofilme com algum grau de aderência. A amostra 36, para a qual *csuE* e *ompA* são ausentes se aderiu fracamente à placa de poliestireno nas condições 4h/37°C, 24h/37°C e 24h/25°C. Quando incubada à 25°C por 48h foi considerada não aderente. Já a amostra 46 (*csuE* negativo e *ompA* positivo) também mostrou fraca aderência à 37°C/4h, 37°C/24h e 25°C/48h; apresentando moderada resistência à 25°C por 24h. É interessante ressaltar que tal amostra é geneticamente idêntica às amostras 40,41 e 42, que carregam tanto *csuE* quanto *ompA*. No entanto, destas, somente a amostra 41 apresenta melhor perfil de adesão ao substrato quando comparada às demais, uma vez que foi caracterizada como moderadamente e fortemente aderente em determinadas condições, como exposto no Anexo Eb. Estes resultados sugerem que a ausência de *csuE* e *ompA* não são determinantes para a interrupção da formação de biofilme em placas de poliestireno, sendo que os mecanismos desenvolvidos por estas amostras ainda precisam ser elucidados.

Achados de De Breij *et al.* (2009) corroboram com nossos resultados, uma vez que identificaram que a formação de pili dependente de *CsuA/BABCDE* não esteve envolvido na aderência de *A.baumannii* ATCC 19606 a células epiteliais do trato respiratório. No nosso estudo não investigamos a presença de *bfmS*, *Bap*, *quorum sensing* ou *bla_{PER-1}*. Neste sentido, amostras cujo gene *csuE* esteve ausente e mesmo assim se mostraram boas produtoras de biofilme nos ensaios fenotípicos em placa de poliestireno podem ser reguladas por outros genes e mecanismos não avaliados no presente estudo.

Segundo Eijkelkamp *et al.* (2011), biofilmes regulados pela expressão do operon *CsuA/BABCDE* são influenciados por modificações em qualquer um dos genes traduzidos downstream. Sendo assim, a expressão de *csuE* pode ter sido afetada por alterações não investigadas no estudo.

No presente estudo identificamos que poucas amostras foram não aderentes nas condições a que foram submetidas. Vale a pena ressaltar os ensaios realizados a 37°C

em 4h de incubação, para verificar a produção rápida de biofilme. 12,9% destas foram consideradas fortemente aderentes, 45,2% moderadamente aderentes, 38,7% fracamente aderentes e somente 3,2% foram não aderentes. No contexto de assistência à saúde este dado nos alerta para o fato de que o micro-organismo em questão tem habilidade para formar biofilmes em tubos orotraqueais e cateteres venosos ou urinários, já nas primeiras horas após a inserção.

Rao *et al.* (2008) mostraram que, dentre os dispositivos médicos, 30% dos biofilmes bacterianos formados são encontrados em tubos endotraqueais, seguidos por cateteres venosos centrais e cateteres urinários. A presença de tubo endotraqueal em pacientes em ventilação mecânica diminui o clearance mucociliar e interrompe o reflexo de tosse, promovendo o acúmulo de secreção traqueobronquial e elevando, assim, o risco de pneumonia (GIL-PEROTIN *et al.*, 2012). Além disso, a inserção deste dispositivo pode promover danos e inocular bactérias da microbiota orofaríngea no trato respiratório baixo. A formação de biofilme na superfície do tubo é um fenômeno universal e tem sido relacionado à patogênese de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV).

Em relação às doenças infecciosas sistêmicas, aquelas da corrente sanguínea (ICS), causadas por micro-organismos Gram negativos são menos comuns que as ocasionadas por Gram positivos. No entanto observa-se um crescimento das ICS por Gram negativos associada a grandes dificuldades terapêuticas devido ao aumento de resistência a antimicrobianos, incluindo *A. baumannii* (LONGO *et al.*, 2014, DJERIBI *et al.*, 2012).

Revdiwala *et al.* (2012) avaliaram 100 culturas bacteriológicas positivas de dispositivos médicos que foram inseridos em pacientes hospitalizados. *A.baumannii* foi recuperado de 69,5% dos tubos endotraqueais avaliados e em 18% dos cateteres venosos centrais (CVC). Todas as amostras formaram biofilme em 16h de incubação a 37°C.

Outra informação importante extraída de nossos experimentos diz respeito à formação de biofilme à temperatura de 25°C. 38,7% e 37,1% das amostras foram consideradas moderadamente e fortemente aderentes, respectivamente, quando incubadas a 25°C por 24h. Já à 25°C por 48h, a maioria das amostras (56,5%) se

mostrou fortemente aderentes. Tais dados representam a grande capacidade de *A.baumannii* em colonizar o ambiente em um curto período de tempo e de modo eficaz.

No cenário hospitalar, principalmente de cuidados intensivos, torna-se um desafio à eliminação de *A.baumannii* do ambiente, através de rotinas de higienização e uso de desinfetantes. Vickery *et al.* (2012) avaliaram a contaminação de equipamentos e mobiliários de uma UTI na Austrália após a limpeza terminal da unidade através de culturas e microscopia eletrônica. A presença de biofilme foi demonstrada visualmente no balde estéril utilizado na limpeza, nas portas, cabos de persianas, borracha de pia e cortinas. Bactérias viáveis foram também recuperadas, por meio de cultura, em persianas e cortinas. De Oliveira *et al.* (2012) identificaram contaminação significativa no ambiente de uma UTI brasileira ($p < 0.004$) e as amostras de *A.baumannii* isoladas do ambiente apresentaram similaridades de 60-80% àquelas identificadas em hemoculturas no período. Ressalta-se que bactérias do gênero *Acinetobacter* são naturalmente encontradas em solo e água, tendo desenvolvido mecanismos de sobrevivência em condições ambientais. Percebe-se que biofilmes contendo micro-organismos MDR, estando o *A.baumannii* dentre eles, parece ser o mecanismo de persistência mais provável no ambiente hospitalar.

Dentre os fatores de virulência descritos para *A.baumannii*, *ompA* tem papel versátil nos processos patogênicos associados à *A.baumannii*, incluindo a formação de biofilme em superfícies abióticas, aderência a células eucarióticas, indução de apoptose em células epiteliais e inibição do complemento.

Diversos patógenos têm desenvolvido estratégias específicas para suprimir a resposta antimicrobiana de células não-fagocíticas a fim de evitar a defesa imune inata. A habilidade de patógenos bacterianos promover a morte celular do hospedeiro parece ser importante para a sobrevivência da bactéria e escape das defesas do hospedeiro e está implicada no mecanismo de patogênese de uma variedade de doenças infecciosas (SMANI *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual *A.baumannii* desempenha sua patogênese ainda não está elucidado. Krzyminska *et al.*, (2012) apresentaram evidências de que *A.baumannii* induz apoptose em células epiteliais em uma localização extracelular, através de adesão às células e contato às células mediado por citotoxicidade. Além do mais, para algumas amostras analisadas por tais autores, o contato bacteriano com as células e invasão subsequente foi requerida para a

citotoxicidade induzida por *A.baumannii* e a morte celular se deu por oncose. Tais resultados sugeriram que a ativação de diferentes vias de morte celular em células epiteliais pode constituir um importante mecanismo patogênico pelo qual este micro-organismo evade o sistema imune e causa doença. Nossos dados configuram, em sua maioria (>80%), morte celular por apoptose em curto período de incubação (3 horas). Tal fato pode estar relacionado à alta concentração bacteriana à qual as células A549 foram expostas, sendo indicado para revisões posteriores, a redução do inóculo bacteriano e acompanhamento da viabilidade celular em crescentes períodos de incubação.

No presente estudo verificamos que a indução de apoptose em células A549 ocorreu independente da presença de *ompA*, como apresentado na Figura 9. Por outro lado, identificamos que, amostras positivas para o gene *ompA* foram capazes de reduzir a contagem celular, com significância estatística, quando comparadas com as amostras *ompA* negativo testadas. No entanto, tratou-se de uma análise preliminar que deverá ser extrapolada para um número maior de amostras em diferentes períodos de incubação e concentrações bacterianas para verificar a tendência de manutenção do comportamento descrito.

Diversas amostras de *A.baumannii* apresentam capacidades distintas de aderência e invasão celular (DE BREIJ *et al.*, 2012; EIJKELKAMP *et al.*, 2011). De acordo com Lee *et al.* (2008), *A. baumannii* adere ao epitélio bronquial através de pequenas protusões do tipo fímbrias na superfície da célula bacteriana. Após a adesão, *A. baumannii* pode invadir as células epiteliais em um mecanismo *zipper-like*, dependente de microtúbulos e microfilamentos (CHOI *et al.*, 2008). Esta interação acarreta em citotoxicidade para a célula hospedeira. Especificamente, durante a infecção às células epiteliais ocorre a *upregulation* de caspases-3, -8, -9, e da polimerase poli[ADP-ribose] que ocasiona a secreção de citocromo c e indução do fator apoptótico pela mitocôndria (CHOI *et al.*, 2005). O estímulo para a ativação e as vias sinalizadoras de apoptose implicadas na morte celular induzida por *A.baumannii* não estão bem estabelecidas. No entanto, envolvem desequilíbrio na homeostase de cálcio, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (SMANI *et al.*, 2011).

RUMBO *et al.*, (2014) afirmam que porinas são fundamentais para a sobrevivência bacteriana, mediante a difusão de nutrientes para dentro da célula e a excreção de metabólitos tóxicos para fora da célula. Tais autores apresentaram evidências de que a perda de Omp33-36 estava associada à diminuição da capacidade patogênica de *A.baumannii*, provavelmente devido à redução da entrada de nutrientes. Neste mesmo estudo de Rumbo *et al.* (2014) avaliou-se a indução de apoptose por Omp 33-36 em células HEp-2 através de DAPI, IP e anexina V. Os resultados sugeriram que Omp33-36 de *A.baumannii* pode induzir apoptose em células humanas. Nosso estudo não investigou a presença ou expressão de outros genes ou fatores relacionados à indução de apoptose em células epiteliais por *A. baumannii*, como Omp33-36. Sendo assim, é provável que amostras negativas para o gene *ompA*, que induziram apoptose em células A549 *in vitro*, possam estar sendo reguladas por outros mecanismos não investigados nesta pesquisa.

Interessantemente, Smani *et al.* (2011) demonstraram que amostras mais susceptíveis a drogas induziram mais morte celular quando comparadas com a morte celular induzida por amostras MDR ou XDR. Tais autores afirmam ainda que a aquisição de resistência a antimicrobianos por *A. baumannii* reduz sua habilidade de matar células A549. Das quatro amostras utilizadas nos ensaios de morte celular, 100% eram resistentes a ceftazidime e meropenem, 25% a gentamicina, 75% a ampicilina-sulbactam e 25% a tigeciclina, sendo que para este último, 75% apresentaram sensibilidade intermediária. Nenhuma amostra foi resistente a polimixina. Percebe-se então que todas as amostras analisadas apresentavam baixa susceptibilidade aos antimicrobianos testados. No entanto, Smani *et al.* (2011) realizou sua análise após 24h de incubação, sendo que não sabemos a partir de quantas horas de incubação a maioria das células entraram em apoptose, para uma comparação mais refinada.

Diversos fatores de risco são associados à aquisição de *A.baumannii* no ambiente hospitalar. De acordo com Gandham (2014), os fatores de risco para colonização ou desenvolvimento de doença infecciosa por *A.baumannii* incluem tempo prolongado de internação, internação em UTI, uso de ventilação mecânica, exposição a agentes antimicrobianos (especialmente carbapenêmicos), pós-operatório recente, exposição a procedimentos invasivos e a gravidade das doenças de base.

No presente estudo, a maioria dos pacientes acompanhados foi do sexo masculino, com média de idade de 61,05 anos (variação de 20 a 85 anos), tendo como principais doenças de base diabetes mellitus e insuficiência cardíaca congestiva. Além disso, 81,1% foram submetidos à ventilação mecânica e fizeram uso de em média três esquemas de antimicrobianos durante a internação, cuja duração foi, em média, 56,6 dias. Noventa e dois por cento dos pacientes participantes do estudo desenvolveram doença infecciosa relacionada à *A.baumannii* e 32,4% evoluíram à óbito. Os dados encontrados corroboram com os achados de Huang *et al.* (2013) que identificaram como fatores de risco individuais para aquisição de *A.baumannii* o paciente ser do sexo masculino, apresentar doença cardíaca isquêmica de base, ter sido submetido a ventilação mecânica e feito uso de antimicrobianos. Tais autores identificaram ainda maior prevalência de *A.baumannii* em pacientes com idade superior a 65 anos, associada à mortalidade de aproximadamente 30%. Chan *et al.* (2014) identificaram que a internação hospitalar por mais de 30 dias foi relacionada, de modo estatisticamente significativo, à maior risco de infecção por *A.baumannii*. Verificaram ainda que, a utilização de antimicrobianos de largo espectro contra Gram negativos, incluindo carbapenêmicos, piperacilina-tazobactam ou cefalosporinas de 4ª geração, foi fator de risco significativo para a aquisição de IRAS por *A.baumannii*.

A média do escore APACHE II encontrada foi de 12,73 pontos (variando de 0 a 28 pontos), com desvio padrão de 7,08 pontos. Chiang *et al.* (2014) identificaram o escore APACHE II médio para a ocorrência de doenças infecciosas por *A.baumannii* de 21 pontos, sendo que 80% destes pacientes evoluíram para óbito. Estudos relatam que o escore APACHE II é útil na estimativa de prognóstico em doenças infecciosas causadas por *A.baumannii* (JOUNG *et al.*, 2010). No entanto, sua análise apresenta algumas limitações, uma vez que algumas informações, como a presença de sepse ou ventilação mecânica não são incluídas na determinação do escore.

Em relação à associação entre a presença de genes de virulência nas amostras de *A.baumannii* avaliadas e o desfecho clínico dos pacientes estudados, identificou-se que a maioria dos que apresentaram o gene *ompA*, individualmente ou concomitantemente a *csuE*, evoluíram a óbito. Tais dados não foram estatisticamente significantes. No entanto, a análise de mortalidade por *A.baumannii* é dificultada pelo perfil do paciente acometido pelas doenças infecciosas causadas por este micro-organismo. Nesse sentido, não foi possível individualizar a análise da presença de genes de virulência das demais

comorbidades e fatores de risco apresentados pelos pacientes acompanhados no estudo. Neves (2012), em estudo realizado no mesmo hospital participante de nossa pesquisa identificou mortalidade hospitalar de cerca de 60% dos pacientes com *A.baumannii*. Destaca-se que a presença do *A. baumannii* é mais frequente em pacientes portadores de comorbidades e de pior prognóstico. Por essa razão, supõe-se que a mortalidade observada nos pacientes com infecções por *A. baumannii* seja causada pelas condições clínicas e não como consequência da infecção.

Ao analisar a duração total de internação para estes pacientes, percebe-se que aqueles que evoluíram a óbito apresentaram um tempo de internação menor que os demais. Este resultado pode ser influenciado por diversos fatores. Dentre eles, o mais provável é que aqueles pacientes que evoluíram a óbito, possivelmente apresentavam doenças infecciosas mais graves ou com maiores comorbidades associadas que os demais, acarretando assim em um tempo de internação menor. Ademais, não foi foco deste estudo avaliar a presença de doenças infecciosas ou colonização por outros microrganismos de importância epidemiológica que poderiam ocorrer simultaneamente à presença de *A.baumannii* e ter influência no desfecho desfavorável do paciente. De acordo com Lemos *et al.* (2014), pacientes com *A.baumannii* resistente a carbapenêmicos apresentaram maior risco de óbito nos 30 dias após o início da doença infecciosa, quando comparados a quadros infecciosos causados por amostras de *A.baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos e não identificaram diferença estatística na duração do tempo de internação em UTI entre os dois grupos de pacientes.

Quando se investigou o impacto da presença ou ausência dos genes de virulência no tempo médio de internação dos pacientes identificou-se que a ausência dos genes de virulência (individualmente ou concomitantemente) aumentou o tempo médio de internação. Estes dados apontam para a tendência, ainda que sem significância estatística, de que a presença de genes de virulência pode acarretar em menor tempo de internação por favorecer o aumento da mortalidade hospitalar destes pacientes. A realização deste estudo com uma amostra maior de pacientes, aliada a uma análise de sobrevivência ajustada por fatores intervenientes (ex. comorbidades) será imprescindível para esclarecer esta possível associação.

Em relação à associação entre a presença de fatores de virulência e a ocorrência de doenças infecciosas por *A.baumannii* identificou-se que 91,2% e 38,2% dos

pacientes que apresentaram o gene *csuE* e *ompA*, respectivamente, desenvolveram doença infecciosa pelo micro-organismo. Quando os dois genes estiveram presentes, esta porcentagem foi de 39,4%. No entanto obteve-se um valor-p equivalente a 0.072, quando analisamos a interferência de *ompA* e *ompA* + *csuE* na ocorrência de doença infecciosa por *A.baumannii*. A ausência de significância estatística nestas correlações pode ser consequência do baixo número de pacientes acompanhados no estudo. A realização de estudos semelhantes com maior margem amostral poderá prover dados mais significativos para uma avaliação estatística. Além disso, a disponibilidade de dados na literatura sobre a influência da presença de genes de virulência de *A.baumannii* no desfecho clínico e nas condições de internação dos pacientes ainda é escassa.

Tais resultados demonstram a criticidade do quadro clínico apresentado pelos pacientes e apontam tendências para o comportamento oportunista de *A.baumannii* e para o fato de sua aquisição ser também um potencial indicador da gravidade dos doentes internados, uma vez que os fatores de risco associados são característicos de pacientes gravemente enfermos.

Devido à importância clínica de *A.baumannii* e a emergência de clones XDR, novos estudos sobre a virulência, patogênese e aquisição de resistência aos antimicrobianos por este micro-organismo são requeridos. Tais estudos irão prover valiosas informações sobre a biologia básica deste patógeno humano, que poderão ser utilizadas como alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias de prevenção.

Por fim, identificou-se que as amostras clínicas de *A.baumannii* analisadas neste estudo apresentaram baixa susceptibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados na terapêutica e expressaram diversos genes de resistência e fatores de virulência que favorecem sua persistência no ambiente hospitalar e acometem pacientes com perfis característicos à internação.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- A resistência bacteriana a antimicrobianos, avaliada pela concentração inibitória mínima pelo método Etest[®] mostrou que são altos os índices de resistência entre as amostras de *A. baumannii* avaliadas, considerando quase todas as classes de antimicrobianos, principalmente aos carbapenêmicos e uma tendência de aumento de resistência à tigeciclina, exceto à polimixina B, que ainda apresenta efetividade *in vitro* contra *A.baumannii*.
- Os genes codificadores de oxacilinases (*bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51}) foram encontrados na quase totalidade das amostras de *A. baumannii* estudadas; já os genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58} e *bla*_{OXA143} não foram identificados em nenhuma amostra analisada. O gene *bla*_{VIM1}, codificador de metalo-β-lactamases, foi detectado na maioria das amostras de *A.baumannii* avaliadas. O elemento de inserção *ISAbal* também foi identificado com frequência nas amostras estudadas, *upstream* a *bla*_{OXA51}.
- Foram encontrados 03 grupos clonais distintos que podem estar sendo disseminados por diferentes vias, como os profissionais da área de saúde e pacientes transferidos entre os hospitais.
- A presença de *ISAbal upstream bla*_{OXA51} parece não ser determinante para o fenótipo de resistência a carbapenêmicos.
- A ausência de *csuE* e *ompA* não alterou a capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno pelas amostras analisadas, demonstrando que outros mecanismos são responsáveis pela regulação da formação de biofilme em *A.baumannii*.
- A presença do gene *csuE* foi associada à presença de *ISAbal* e à ausência de resistência à gentamicina nas amostras avaliadas (p<0.05).

- Resistência à gentamicina foi significativa nas amostras que formaram biofilme em placas de poliestireno a 24h/37°C, 24h/25°C e 48h/25°C ($p < 0.05$).
 - A indução de apoptose em células A549 ocorreu independente da presença de *ompA*, mas amostras positivas para tal gene foram capazes de reduzir a contagem celular, com significância estatística, quando comparadas com as amostras *ompA* negativo testadas ($p < 0.05$).
 - Mais de 80% das células A549 inoculadas com amostras clínicas de *A.baumannii* apresentaram morte celular por apoptose em curto período de incubação (3 horas).
 - Noventa e dois por cento dos pacientes participantes do estudo desenvolveram doença infecciosa relacionada à *A.baumannii* e 32,4% evoluíram a óbito.
 - A maioria dos pacientes acompanhados no estudo que apresentaram o gene *ompA*, individualmente ou concomitantemente a *csuE*, evoluíram a óbito.
 - Um menor tempo de internação foi encontrado para aqueles pacientes que evoluíram a óbito quando comparado aos pacientes que receberam alta ou foram transferidos para outras instituições.
 - A ausência dos genes *csuE* e *ompA* (individualmente ou agrupados) favoreceu o aumento do tempo médio de internação dos pacientes.
 - Cerca de noventa e um por cento e 38,2% dos pacientes que apresentaram o gene *csuE* e *ompA*, respectivamente, desenvolveram doença infecciosa por *A.baumannii*. Quando os dois genes estiveram presentes, esta porcentagem foi de 39,4%.
- Devido à importância clínica de *A.baumannii* e à emergência de clones XDR, novos estudos sobre a virulência, patogênese e aquisição de

resistência aos antimicrobianos por este micro-organismo e o impacto destes fatores no desfecho clínico dos pacientes são necessários para maior esclarecimento sobre a biologia básica do micro-organismo, que poderá ser utilizado no desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias de prevenção. Estes resultados reforçam a importância clínico-epidemiológica de *A.baumannii* no ambiente hospitalar e fornecem dados importantes sobre a epidemiologia molecular e expressão de genes de resistência e virulência por este micro-organismo no cenário hospitalar brasileiro.

REFERÊNCIAS

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

ABBOTT, I.,J.; PELEG, A.,Y. *Acinetobacter baumannii* and hospital infections. **Microbiology Australia**, v.10, n.1, p. 54-56, Mar 2014.

ADAMS-HADUCH, J. M. *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3849-54, Nov 2011.

ADRIAENSSENS N, *et al.* European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe (1997–2009). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n.1, vi3–vi12, 2011.

AGRESTI, A. *Categorical data analysis*. 2ed. John Wiley & Sons, 2002.

ANTONIO, C. S. *et al.* High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 3, p. 1322-3, Mar 2011.

ANTUNES, L.C.S., *et al.* *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 0, n. 1, p.1-10, Ago 2014.

AZIZI,O. *et al.* Molecular detection of class-D OXA carbapenemase genes in biofilm and non-biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Jundishapur J Microbiol**, v.8, n.1, e21042, 2015.

BAKOUR, S. *et al.* Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 529-531, Ago 2013.

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. **Int. J. Antimicrob. Agents** v.41,n.1, p. 75–79, Jan 2013.

BAZYLEU, A., KUMAR, A. Incubation temperature, osmolarity, and salicylate affect the expression of resistance–nodulation–division efflux pumps and outer membrane porins in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606^T. **FEMS Microbiology Letters**, v.357, n.2 p.136–143, Ago 2014.

BEDENIC, B. *et al.* Nursing Home as a Reservoir of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microb Drug Resist**, Jan 2015.

BERLAU, J. *et al.* Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. **J Hosp Infect**, v. 42, n.3, p. 201–204, Jul 1999.

BETROSIAN, A. P. *et al.* Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **J Infect**, v. 56, n. 6, p. 432-6, Jun 2008.

BHARGAVA, N., *et al.* Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 36, n. 4, p.349–360, Nov 2010.

BLAIR, J. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 42-51, Jan 2015.

BONETT, D. G., PRICE, R. M. Inferential Methods for the Tetrachoric Correlation Coefficient. **Journal of Educational and Behavioral Statistics**, v.30, n.2, p.213-225, Jun 2005.

BORDENAVE, S., *et al.* Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 19, p. 6089–6097, Out 2007.

BOU, G., *et al.* Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. **J Clin Microbiol**, v.38, n.9, p.3299-3305, Set 2009.

BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY (BSAC). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing, Abr 2014.

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

BUSH, K., JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.54, n.3, p. 969–976, Mar 2010.

BYRNE-BAILEY, K.,G. *et al.* Prevalence of sulphonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p.696-702, Fev 2009.

CABRAL, M. P. *et al.* Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. **J Proteome Res**, v. 10, n. 8, p. 3399-417, Ago 2011.

CAPONE, A. *et al.* In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 2, p. 422-3, Ago 2008.

CARVALHO-ASSEF, A. P. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2956-7, Dez 2013.

CATEL-FERREIRA, M. *et al.* Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.9, p.2053-2056, Set 2011.

CHAN, J. D.; GRAVES, J. A.; DELLIT, T. H. Antimicrobial treatment and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **J Intensive Care Med**, v. 25, n. 6, p. 343-8, Nov-Dez 2010.

CHAN, M. C. *et al.* Risk factors for healthcare-associated extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a case-control study. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85973, 2014.

CHO, Y. J. *et al.* Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 2, p. 185-90, Jun 2009.

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

CHOI, C. H. *et al.* *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 309-19, Feb 2008.

CHOI, A. H. *et al.* The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. **J Bacteriol**, v. 191, n. 19, p. 5953-63, Out 2009.

CHOI J.,Y., *et al.* *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 2, p. 177–180, Out 2012.

CHOW, J.Y., *et al.* Disruption of biofilm formation by the human pathogen *Acinetobacter baumannii* using engineered quorum-quenching lactonases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n. 3, p. 1802–1805, Mar 2014.

CHUANG, Y. C. *et al.* Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 3, p. 352-60, Fev 2011.

CISNEROS, J. M.; RODRIGUEZ-BANO, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 11, p. 687-93, Nov 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S23—Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. This document includes important information that laboratorians need to know about antimicrobial susceptibility testing (AST) and provides updated tables for the CLSI AST standards M02-A11, M07-A9, and M11-A8, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S23—Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. This document includes important information that laboratorians need to know about antimicrobial susceptibility testing (AST) and

provides updated tables for the CLSI AST standards M02-A11, M07-A9, and M11-A8, 2014.

CHIANG, T. *et al.* Bacteremia caused by *Acinetobacter baumannii*: epidemiologic features, antimicrobial susceptibility, and outcomes. **Advances in Infectious Diseases**, v. 4, n.1, p. 66-71, 2014.

COLLIS, C. M. *et al.* Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 5, p. 1415-27, Dez 2002.

COOKSON B. The working party guidance on the control of multi-resistant *Acinetobacter* Outbreaks. [Internet] . Disponível em::<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Acinetobacter/Guidelines/>.

COUDRON, P.E., MOLAND E.S. AND THOMSON K.S. Occurrence and detection of AMP C beta- lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans medical centre. **J. Clin. Microbiol.**, v.38 p.1791-1796, 2000.

CUTHBERTSON, L. *et al.* Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, n. 1, p. 155-77, Mar 2009.

DAMIER-PIOLLE, L. *et al.* AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 2, p. 557-62, Fev 2008.

DE BREIJ, A. *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. **Res Microbiol**, v. 160, n. 3, p. 213-8, Abr 2009.

DE BREIJ, A. *et al.* Three-dimensional human skin equivalent as a tool to study *Acinetobacter baumannii* colonization. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2459-64, Mai 2012.

DE OLIVEIRA, A. C. *et al.* Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 2, p. 186-7, Mar 2012.

DENG, M. *et al.* Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 297-303, 2014.

DJERIBI, R. *et al.* Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 9, p. 854-9, Nov 2012.

DONG, R. *et al.* The correlation study on antimicrobial resistance and biofilm related genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v. 25, n. 8, p. 493-4, Ago 2013.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 8, p. 1387-92, Out 2001.

DURMAZ, S. *et al.* Detection of β -lactamase genes, ERIC-PCR typing and phylogenetic groups of ESBL producing quinolone resistant clinical *Escherichia coli* isolates. **Biomed Res- India**, v.26, n.1, p.43-50, 2015.

EIJKELKAMP, B. A. *et al.* Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **FEMS Microbiol Lett**, v. 323, n. 1, p. 44-51, Out 2011.

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

FALLAH, F. *et al.* Prevalence of *bla*_{NDM}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran. **Scientifica (Cairo)**, v. 2014, p. 245162, 2014.

FARRELL D.,J. *et al.* Ceftolozane/tazobactam activity tested against Gram-negative bacterial isolates from hospitalised patients with pneumonia in US and European medical centres. **Int J Antimicrob Agents**, v. 43, n.6, p. 533-539, Jun 2014.

FERREIRA, J. A. B. Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado) - **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2009.

FONSECA, E.L., *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. **BMC Microbiol**, v.13, n.1, p.1-7, Nov 2013.

FOURNIER P.E., *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genet**. v.2, n.1, p. 62-72, Jan 2006.

GADDY, J. A.; TOMARAS, A. P.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3150-60, Aug 2009.

GALES, A. C., TOGNIM, M. C., REIS, A. O., *et al.* Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v.45, p. 77-9, 2003.

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

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

- GAYOSO, C. M. *et al.* Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. **J Proteome Res**, v. 13, n. 2, p. 460-76, Fev 2014.
- GIL-PEROTIN, S. *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. **Crit Care**, v. 16, n. 3, p. R93, 2012.
- GOH, H. M. *et al.* Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 21, p. 6535-43, Nov 2013.
- GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 3, p. 219-26, Mar 2010.
- GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32 Suppl 1, p. S2-9, Nov 2008..
- GRIFFITH, M.E.,*et al.* *Acinetobacter* skin colonization of US Army soldiers. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, n.7, p. 659-661, Jul 2006.
- HAMMAMI, S., BOUTIBA-BEN BOUBAKER, I., GHOZZI, R., SAIDANI, M., AMINE, S., BEN -REDJEB, S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. **Diagn Pathol**. V.28, p. 106, 2011.
- HARDING, C. M. *et al.* *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. **MBio**, v. 6, n. 4, Ago 2013.
- HERITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal1 in *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 2, p. 123-30, Fev 2006.
- HIGGINS, P.G, LEHMANN, M., SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n. 3, p 305, Mar 2010.
- HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v.6, n.2, p. 65–70, 1979.
- 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**, vol. 9, n.1, p. 26-33, Jan. 2014.
- HOUANG E.,T. *et al.* Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **J Clin Microbiol**, v.39, n.1, p.228–234, Jan 2001.
- HUANG, J. *et al.* Sources of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and its role in respiratory tract colonization and nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 10, p. 1826-31, 2013.

HUYS, G. *et al.* Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. **Res Microbiol**, v. 156, n. 3, p. 348-55, Apr 2005.

HUYS, G., *et al.* Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. **Res Microbiol**, v. 158, n. 3, p. 228–235, Apr 2007.

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

JEONG, J. J. *et al.* Role of annexin A5 in cisplatin-induced toxicity in renal cells: molecular mechanism of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 289, n. 4, p. 2469-81, Jan 2014.

JIN, J. S. *et al.* *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17027, 2011.

JOUNG, M. K. *et al.* Impact of inappropriate antimicrobial therapy on outcome in patients with hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. **J Infect**, v. 61, n. 3, p. 212-8, Set 2010.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 10, p. 2253-4, Oct 2010.

KENYON, J. J., HALL, R. M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e62160, Abr 2013.

KENYON, J. J. *et al.* Structure of the K2 capsule associated with the KL2 gene cluster of *Acinetobacter baumannii*. **Glycobiology**, v. 24, n. 6, p. 554-63, Jun 2014.

KIDD, T. J. *et al.* Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 263-8, Jan 2011.

KIM, S. A. *et al.* Global gene expression patterns and induction of innate immune response in human laryngeal epithelial cells in response to *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 45-52, Out. 2008.

KIM, Y. J. *et al.* Risk factors for mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: impact of appropriate antimicrobial therapy. **J Korean Med Sci**, v. 27, n. 5, p. 471-5, Mai 2012.

KIM D.H. *et al.* Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 in Asia and AbaR-type resistance islands. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.5239-5246, Nov 2013.

KINSELLA, R. L.; SCOTT, N. E.; FELDMAN, M. F. Clinical implications of glycoproteomics for *Acinetobacter baumannii*. **Expert Rev Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 1-3, Fev 2015.

- KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.110, n.28, p.E2629–E2634, Jun 2013.
- KRZYMINSKA, S.; FRACKOWIAK, H.; KAZNOWSKI, A. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. **Curr Microbiol**, v. 65, n. 3, p. 319-29, Set 2012.
- KUEHN, M. J.; KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. **Genes Dev**, v. 19, n. 22, p. 2645-55, Nov 2005.
- KWON, S. O. *et al.* Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. **FEMS Microbiol Lett**, v. 297, n. 2, p. 150-6, Ago 2009.
- LAVIGNE, J. P. *et al.* An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 41, n.2, p.130–136, Fev 2013.
- LEE, S.Y., POON W. Y., BENTLER P. M. *A two-stage estimation of structural equation models with continuous and polytomous variables.* British Journal of Mathematical and Statistical Psychology, 1995: 339–358.
- LEE, J. C. *et al.* Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. **APMIS**, v. 109, n. 10, p. 679-84, Out 2001.
- LEE, K. *et al.* Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, Nov 2005.
- LEE, J. C. *et al.* Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Res Microbiol**, v. 157, n. 4, p. 360-6, Mai 2006.
- LEE, J. S. *et al.* Outer membrane protein A of *Acinetobacter baumannii* induces differentiation of CD4+ T cells toward a Th1 polarizing phenotype through the activation of dendritic cells. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 1, p. 86-97, Jun 2007.
- LEE, H. W. *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 1, p. 49-54, Jan 2008.
- LEE, J. S. *et al.* *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. **J Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 387-92, Jun 2010.
- LEE, Y. *et al.* A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.1, p.361-363, Jan 2011.

- LEMOS, E. V. *et al.* Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 5, p. 416-23, Mai 2014.
- LI, Y. *et al.* Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 beta-lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 48, n. 1, p. 101-8, Fev 2015.
- LIM, S. M.; WEBB, S. A. Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. **Anaesthesia**, v. 60, n. 9, p. 887-902, Set 2005.
- LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, Dez 2014
- LOEHFELM, T. W.; LUKE, N. R.; CAMPAGNARI, A. A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **J Bacteriol**, v. 190, n. 3, p. 1036-44, Fev 2008.
- LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 119-27, Abr 2014.
- LYNCH, J. P. *et al.* Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). **Expert Opin. Pharmacother**. v.14, n.2, p.199–210, Fev 2013.
- MAGIORAKOS, A.P., *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v.18, n.3, p.268-281, Mar 2012.
- MARA, K., *et al.* Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. **Res Microbiol**, v. 163, n.3, p.161–172, Abr 2012.
- MARINO, G. *et al.* Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 81-94, Fev 2014.
- MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1866-71, Mai 2011.
- MARTI, S. *et al.* Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26030, 2011.
- MARTINS, H. S. *et al.* Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 2, p. 1465-78, Fev 2014.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol Rev**, v. 37, n. 2, p. 130-55, Mar 2013.

MENDES, R. E. *et al.* Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4693-702, Dez 2004.

MENDES, R. E. *et al.* Metallo- β -lactamases. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 2, p. 103-113, Abr 2006.

MENDES, R. E. *et al.* Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 1, p. 55-9, Jan 2009.

MENDES, R. E. *et al.* Comprehensive assessment of tigecycline activity tested against a worldwide collection of *Acinetobacter* spp. (2005-2009). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 307-11, Nov 2010.

MINGOTI, S. A. *Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: Uma Abordagem Aplicada*. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

MOFFATT, J.H., *et al.* Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.12, p. 4971-4977, Dez 2010.

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

MORFIN-OTERO, R.; DOWZICKY, M. J. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. **Clin Ther**, v. 34, n. 1, p. 101-12, Jan 2012.

MORGAN, D. J. *et al.* Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 31, n. 7, p. 716-21, Jul 2010.

MORTENSEN, B. L.; SKAAR, E. P. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 9, p. 1336-44, Set 2012.

MUSSI M.A,*et al.* CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. **FEBS Lett**, v.581, n.29, p.5573-5578, Dez 2007.

MURPHY, T. A. *et al.* Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 2, p. 582-7, Fev 2003.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 4, p. 772-4, Abr 2007.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE NETWORK (UHESA) report. Summarized data; 2012.

NEMEC, A. *et al.* Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 12, p. 1233-40, Dez 2004.

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

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

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

NORDMANN, P., POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin. Microbiol. Infect.** v.8, n.6, p.321–331, Jun 2002.

NORDMANN, P. *et al.* Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 5, p. 1070-8, Mai 2011.

NORRIS, A. L.; SERPERSU, E. H. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. **Protein Sci**, v. 22, n. 7, p. 916-28, Jul 2013.

NWUGO, C. C. *et al.* Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51936, 2012.

OGUTLU, A. *et al.* Effects of Carbapenem consumption on the prevalence of *Acinetobacter* infection in intensive care unit patients. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 13, p. 7, 2014.

PAGANO, M. *et al.* Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 2, p. 330-3, Fev 2013.

PARK, Y. S. *et al.* Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases--a multicentre study. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, n. 5, p. 430-5, Nov 2010.

PELEG, A. Y.; ADAMS, J.; PATERSON, D. L. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 2065-9, Jun 2007.

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

PELEG, A. Y. *et al.* The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46984, 2012.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 382-402, Abr 2006.

PILLONETTO, M. *et al.* First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.58 n.12, p. 7592-7594, Dez 2014.

POGUE, J. M. *et al.* Revisiting "older" antimicrobials in the era of multidrug resistance. **Pharmacotherapy**, v. 31, n. 9, p. 912-21, Set 2011.

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

POOLE, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 3, n. 2, p. 77-98, Jun 2002.

POON, I. K. *et al.* Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 329-34, Mar 2014.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 9, p. 826-36, Sep 2006.

POIREL, L. *et al.* A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1594-8, Ago 2010.

POULOU, A. *et al.* Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. **J. Clin. Microbiol.** v.51, n. 10, p.3176–3182, Out 2013.

PRINCIPE, L. *et al.* Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 8, p. 3004-10, Ago 2014.

RAO, R. S. *et al.* Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 4, p. 333-7, Out-Dez 2008.

REVDIWALA, S.; RAJDEV, B. M.; MULLA, S. Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. **Crit Care Res Pract**, v. 2012, p. 945805, 2012

RICCIARDI, R.; RICCIARDI, A. M.; DANZI, G. In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Infez Med**, v. 17, n. 4, p. 236-9, Dez 2009.

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

ROBLEDO, I. E. *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 1354-7, Mar 2010.

ROMANOWSKA, J.; REUTER, N.; TRYLSKA, J. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. **Proteins**, v. 81, n. 1, p. 63-80, Jan 2013.

ROHLF, J.F. **NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1 Exeter Software. Setauket. NY, 2000.

RUMBO, C. *et al.* The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. **Infect Immun**, v. 82, n. 11, p. 4666-80, Nov 2014.

RUMBO-FEAL, S., *et al.* Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. **PLoS One**. V.8, n.8, e72968, Aug 2013.

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

RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P. A. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 5, p. 1001-4, Mai 2007.

SAHL, J. W. *et al.* Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54287, 2013.

SARMA P.M, *et al.* Assessment of intra-species diversity among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. **Can J Microbiol**, v. 50, n.6, p.405–414, Jun 2004.

SEWARD, R. J.; LAMBERT, T.; TOWNER, K. J. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. **J Med Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 455-62, Mai 1998.

SIEGAL, S.; E, CASTELLAN, J. N. *Estatística Não Paramétrica para Ciências do Comportamento*. Porto Alegre: Artmed, 2006.

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

SMANI, Y. *et al.* Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 58, n. 3, p.1806-1808, Mar 2014.

SOMPOLINSKY D., NITZAN, Y., TETRY, S. Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 55, 119–122, 2005.

SPELLBERG, B.; BONOMO, R. A. The deadly impact of extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Crit Care Med**, v. 42, n. 5, p. 1289-91, Mai 2014.

SRINIVASAN, V. B.; RAJAMOHAN, G.; GEBREYES, W. A. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5312-6, Dez 2009.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-9, Abr 2000.

SU, X. Z. *et al.* AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4362-4, Out 2005.

SUN, J. R. *et al.* A truncated AdeS kinase protein generated by IS*Aba1* insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49534, 2012.

SUN, Y. *et al.* The emergence of clinical resistance to tigecycline. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 2, p. 110-6, Fev 2013.

SUN, C. *et al.* Mutant prevention concentrations of levofloxacin, pazufloxacin and ciprofloxacin for *A. baumannii* and mutations in *gyrA* and *parC* genes. **J Antibiot**, v.1, n.5, Nov 2014.

THE CENTER FOR DISEASE DYNAMICS ECONOMICS & POLICY website. <http://www.cddep.org/ResistanceMap/bug-drug/AB-CP>

THE SURVEILLANCE NETWORK USA. www.cddep.org/ResistanceMap/bug-drug/AB-MDR (Accesso 7 novembre 2014)

TOMARAS, A. P. *et al.* Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 12, p. 3473-84, Dez 2003.

TOMARAS, A. P. *et al.* Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 11, p. 3398-409, Nov 2008.

TOUCHON, M. *et al.* The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome Biol Evol**, v. 6, n. 10, p. 2866-82, Out 2014.

TRAUTNER, B. W.; DAROUICHE, R. O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **Am J Infect Control**, v. 32, n. 3, p. 177-83, Mai 2004.

TURTON, J. F. *et al.* The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, n. 1, p. 72-7, Mai 2006.

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

VALA, M.H, *et al.* Detection of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. **Annals of Burns and Fire Disasters**, vol. 27, n. 1, p. 8-13, Mar 2014.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 742-50, Ago 2014.

VARGIU, A. V., NIKAIDO, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.109, n.50, p.20637–20642, Dez 2012.

VICKERY, K. *et al.* Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 80, n. 1, p. 52-5, Jan 2012.

VILA, J.; MARTI, S.; SANCHEZ-CESPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 6, p. 1210-5, Jun 2007.

VOULGARI, E. *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiol**. v.8, n. 27–39 Jan 2013.

WIECZOREK, P. *et al.* Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 46, n. 3, p. 257-67, 2008.

WILKS, M. *et al.* Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, n. 7, p. 654-8, Jul 2006.

WOODFORD, N., FAGAN, E. J, ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. **J Antimicrob Chemother**. V.57, p.154-5. 2006.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 10, p. 1451-70, Jul 2005.

WRIGHT, M. S. *et al.* New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e00963-13, Jan 2014.

YAN, J. J. *et al.* Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2224-8, Aug 2001.

YOUNG, D. *et al.* Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo- β -Lactamase Gene, blaAIM-1, and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.12, p.6154-6159, Dez 2012.

ZARRILLI, R. *et al.* Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 1, p. 11-9, Jan 2013.

ZEANA, C. *et al.* The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.24, n. 4, p.275–279, Abr 2003.

ZHANG, R. *et al.* Annexin A5-conjugated polymeric micelles for dual SPECT and optical detection of apoptosis. **J Nucl Med**, v. 52, n. 6, p. 958-64, Jun 2011.

ZONG, Z.; ZHANG, X. blaNDM-1-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 5, p. 1007-10, Mai 2013.

ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

Termo de consentimento:

Eu _____ declaro que fui informado (a) a respeito da pesquisa “**colonização ou infecção por bacilos Gram negativos não-fermentadores (BGNNF): impacto na morbidade e na mortalidade analisadas durante a internação e após a alta hospitalar.**” e estou ciente que os riscos decorrentes da realização do *swab* são mínimos ou inexistentes e que as informações obtidas são sigilosas e serão somente utilizadas para fins desta pesquisa.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Paciente ou responsável: _____

Investigador que forneceu as informações ao paciente: _____

Anexo B – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética



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

Projeto: CAAE – 01402312.6.0000.5149

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

DECISÃO

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

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo C – Resultados da CIM aos antimicrobianos das 62 amostras de *A.baumannii* testadas pelo método Etest®

Amostra	CIM, mg/ml					
	Ampicilina-Sulbactam	Gentamicina	Ceftazidime	Tigeciclina	Polimixina	Meropenem
01	6	1.5	>256	0.47	38	>32
02	6	>3.2	2	25	25	>32
03	16	1.5	>256	38	38	>32
04	24	2	>256	50	38	>32
05	6	>32	2	25	38	>32
06	48	48	>256	38	50	>32
07	48	>1024	>256	75	75	>32
08	24	2	3	50	50	>32
09	>48	2	3	50	75	>32
10	12	4	3	>50	50	>32
11	24	>1.5	>256	38	38	>32
12	>12	0.75	1.5	38	50	>32
13	6	3	>256	1.5	38	>32
14	12	1.5	>256	38	38	>16
15	24	2.0	>256	38	38	>32
16	32	1.0	>256	38	50	>32
17	16	96	>192	1.0	50	>32
18	>16	>48	>256	75	50	>32
19	6	24	48	1.0	3	>32
20	16	192	64	1.5	50	>32
21	24	1.0	>256	75	50	>32
22	16	2	>256	75	38	>32
23	24	2	2	38	75	>32
24	12	6	>256	38	38	>32
25	>16	>256	>256	75	50	>32
26	16	192	>256	1.0	50	>32
27	48	3	4	75	75	>32
28	4	4	>256	38	50	1.0
29	24	3	4	1.0	75	>32
30	8	1.5	>256	50	38	>16
31	32	1.0	>256	38	50	>32
32	8	96	>24	75	50	12
33	16	12	>256	125	75	>32
34	38	>64	3	38	75	>32
35	12	>1024	>256	25	50	>32
36	12	>12	>256	19	75	>32
37	24	1.0	>256	38	50	>32
38	24	1.5	3	75	50	>32
39	>192	8	>256	1.0	50	>32
40	12	1.5	>256	38	25	>12
41	12	1.0	>256	38	38	>12
42	16	1.5	>48	1	50	>32
43	32	>64	>24	38	75	>32
44	12	1.0	>256	38	25	>32
45	24	1.0	>256	38	50	>32
46	16	2.0	>256	38	38	>12
47	6	1.5	>256	50	19	>32
48	>32	2	3	25	38	>32
49	>24	48	>256	75	50	>32
50	24	1.5	>256	38	75	>32
51	>96	4	4	75	50	>32
52	12	1.5	>256	50	38	>32
53	16	1.5	>256	50	>38	>32
54	16	1.5	>256	50	38	>32
55	>8	>24	2	19	50	>32
56	24	2	>256	50	38	>32

57	12	3	>256	25	50	>32
58	6	3	>256	1.5	38	>32
59	6	12	96	19	38	>12
60	24	2	2	50	50	>32
61	16	1.0	>256	38	50	>24
62	>12	0.75	1.5	38	50	>32

Anexo D – Descrição das variáveis analisadas na construção dos gráficos de contagem de células versus concentração do inóculo bacteriano

Concentração	24h				48h				72h			
	1º Q	Mediana	3º Q	E.P.	1º Q	Mediana	3º Q	E.P.	1º Q	Mediana	3º Q	E.P.
Controle	1572,5	2009,0	2771,0	200,6	1795,5	2603,0	3522,0	363,3	1881,0	3114,0	3998,5	327,4
10,1	1516,5	2370,0	2604,5	192,3	25,0	31,0	38,5	3,1	5,5	10,0	20,0	2,6
10,2	1207,5	1517,0	2379,0	198,3	17,0	30,0	46,5	6,7	7,5	16,0	18,5	2,1
10,3	1365,0	1862,0	2321,5	191,0	17,0	23,0	31,0	3,6	9,5	12,0	19,0	1,8
10,4	1145,5	1509,0	2566,5	320,9	15,5	23,0	35,5	3,5	10,5	13,0	14,5	1,2
10,5	959,0	1740,0	2211,5	224,9	16,5	31,0	36,5	3,9	8,5	13,0	13,0	1,2
10,6	73,5	485,0	1446,5	332,0	13,0	16,0	36,0	3,8	4,0	13,0	17,5	2,0
10,7	7,0	13,0	15,5	5,8	12,0	21,0	25,5	3,3	5,5	8,0	14,0	2,0
10,8	5,0	6,0	12,5	3,1	7,5	12,0	16,5	1,8	10,0	11,0	12,5	0,6
Controle	898,0	2137,0	3195,5	298,8	1407,5	2300,0	3326,5	306,0	2009,0	2531,0	3176,5	248,1
10,1	1562,5	2168,0	2851,5	2100,2	10,5	15,0	27,0	3,3	4,5	10,0	19,5	2,7
10,2	1281,0	2182,0	3012,5	259,6	11,5	13,0	19,0	2,2	12,5	16,0	19,0	2,0
10,3	1007,5	1865,0	2674,5	254,2	10,0	16,0	19,0	1,6	11,5	14,0	19,5	2,1
10,4	961,5	1342,0	2483,0	234,3	12,5	14,0	17,0	1,4	10,5	15,0	21,5	2,1
10,5	529,5	1783,0	2480,0	365,8	9,0	11,0	21,0	2,1	14,0	17,0	20,0	1,7
10,6	508,5	1436,0	1917,0	287,1	5,0	14,0	19,0	2,9	13,0	18,0	23,5	1,9
10,7	8,5	13,0	16,0	2,5	10,0	11,0	13,0	1,1	11,5	15,0	20,5	2,6
10,8	7,5	15,0	21,5	2,4	10,0	12,0	14,0	1,0	12,5	18,0	29,0	3,3
Controle	1087,5	1696,0	3701,5	417,9	1738,5	2343,0	3834,5	404,0	1986,5	2543,0	3577,5	263,5
10,1	800,0	1485,0	2796,5	311,6	87,5	124,0	228,0	37,0	17,0	36,0	54,0	10,1
10,2	466,5	1339,0	3071,0	355,6	70,5	108,0	287,5	31,8	15,0	36,0	57,5	8,1
10,3	848,0	1567,0	2214,0	236,4	47,0	166,0	250,0	35,3	13,0	19,0	41,5	7,5
10,4	560,0	1273,0	2266,0	238,7	70,0	153,0	221,0	26,5	11,0	16,0	42,0	6,7
10,5	623,5	1186,0	1675,0	252,1	92,0	137,0	226,5	32,5	22,0	24,0	37,0	3,8
10,6	320,5	585,0	1140,5	178,6	66,5	101,0	203,5	40,8	13,5	34,0	37,5	5,2
10,7	125,0	375,0	1152,5	196,1	19,0	39,0	58,5	7,8	10,0	17,0	42,5	4,8
10,8	84,5	233,0	490,0	97,4	18,5	26,0	42,0	4,2	8,5	10,0	16,0	2,2
Controle	493,0	2122,0	2920,5	380,9	1038,0	3247,0	3910,0	433,0	2374,5	2526,0	3260,0	252,6
10,1	760,0	2295,0	2948,0	378,1	103,5	137,0	1490,0	308,9	16,0	31,0	53,0	21,9
10,2	718,0	1809,0	3079,0	353,1	115,5	750,0	1287,0	199,8	14,0	27,0	67,0	22,7
10,3	442,5	2168,0	2770,5	342,0	69,5	249,0	651,5	217,4	12,0	31,0	59,5	24,1
10,4	382,5	1144,0	2165,0	298,2	221,0	283,0	806,5	206,6	16,5	41,0	82,0	11,4
10,5	302,5	877,0	2074,5	398,4	129,0	274,0	324,5	45,2	21,0	24,0	41,5	12,2
10,6	208,0	833,0	1815,5	298,0	14,0	24,0	70,0	9,6	21,0	26,0	57,5	6,1
10,7	53,0	148,0	341,5	64,9	6,5	24,0	46,0	14,5	12,0	19,0	48,5	6,2
10,8	15,5	30,0	153,0	39,8	10,5	21,0	32,5	4,7	9,5	22,0	38,0	5,4

Anexo E – Perfil fenotípico e genotípico das 62 amostras clínicas de *A.baumannii* avaliadas no estudo

Amostra	<i>bla</i> _{OXA 23}	<i>bla</i> _{OXA 24}	<i>bla</i> _{OXA 51}	<i>bla</i> _{OXA 58}	<i>bla</i> _{OXA143}	<i>bla</i> _{VIM-1}	ISAb _a 1	<i>csuE</i>	<i>ompA</i>	RESULTADO A570 meio 4h/37°C	RESULTADO A570 24h/37°C	RESULTADO A570 24h/temp. amb	RESULTADO A570 48h/temp. amb	Ampicilina- sulbactam	Gentamicina	Ceftazidime	Tigeciclina	Polimixina	Meropenem	Metalobetala- tamase
1	P	N	P	N	N	P	P	P	N	(++)	(++)	(++)	(++)	I	S	R	S	S	R	P
2	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(+)	(+)	(++)	(+++)	I	S	S	S	S	R	P
3	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(++)	(++)	(+)	R	S	R	I	S	R	P
4	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	R	S	R	R	S	R	P
5	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(++)	(+)	(+++)	(+++)	I	R	S	S	S	R	P
6	P	N	P	N	N	P	P	P	N	(++)	(++)	(+)	(+++)	R	R	R	I	S	R	P
7	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
8	P	N	P	N	N	N	P	N	N	(+)	(++)	(++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	N
9	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	N
10	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(++)	(+++)	I	S	S	R	S	R	P
11	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+)	(+)	(++)	(++)	R	S	R	I	S	R	P
12	P	N	P	N	N	P	P	P	N	(++)	(+++)	(++)	(+++)	I	S	S	I	S	R	P
13	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	I	S	R	R	S	R	P
14	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(+)	(+)	(++)	I	S	R	I	S	R	P
15	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(+)	(+)	(+)	R	S	R	I	S	R	P
16	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(+)	(+)	(+)	R	S	R	I	S	R	P
17	P	N	P	N	N	N	N	N	N	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
18	P	N	P	N	N	N	P	N	N	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	R	R	R	R	S	R	P
19	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	I	R	R	R	I	R	P
20	P	N	P	N	N	N	P	N	N	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
21	P	N	P	N	N	N	P	P	P	(++)	(+)	(+)	(+)	R	S	R	R	S	R	P
22	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(++)	(++)	(+++)	R	S	R	R	S	R	P
23	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	R	S	S	I	S	R	P
24	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	I	I	R	I	S	R	P
25	P	N	P	N	N	P	N	N	N	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
26	P	N	P	N	N	P	N	N	N	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
27	P	N	P	N	N	N	N	N	N	(++)	(+++)	(++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	P
28	N	N	P	N	N	P	P	P	P	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	S	S	R	I	S	S	P
29	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	P
30	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	na	(+)	(+)	I	S	R	R	S	R	P
31	P	N	P	N	N	N	P	P	P	(++)	na	(+)	(+)	R	S	R	I	S	R	N
32	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	I	R	I	R	S	R	P
33	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(++)	(++)	(++)	(+)	R	I	R	S	S	R	P
34	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(+)	(++)	(++)	(+++)	R	R	S	I	S	R	P
35	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	I	R	R	S	S	R	P
36	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(+)	(+)	na	I	I	R	S	S	R	P
37	P	N	P	N	N	P	N	N	P	na	(++)	(++)	(+++)	R	S	R	S	S	R	P

Anexo E (continuação) – Perfil fenotípico e genotípico das 62 amostras clínicas de *A.baumannii* avaliadas no estudo

Amostra	<i>bla</i> _{OXA 23}	<i>bla</i> _{OXA 24}	<i>bla</i> _{OXA 51}	<i>bla</i> _{OXA 58}	<i>bla</i> _{OXA143}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>ISAba 1</i>	<i>csuE</i>	<i>ompA</i>	RESULTADO A570 meio 4h/37°C	RESULTADO A570 24h/37°C	RESULTADO A570 24h/temp. amb	RESULTADO A570 48h/temp. amb	Ampicilina- sulbactam	Gentamicina	Ceftazidime	Tigeciclina	Polimixina	Meropenem	Metalobetalac tamase
38	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	P
39	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+)	(+)	na	(++)	R	I	R	R	S	R	P
40	P	N	P	N	N	N	P	P	P	(++)	na	(+)	(++)	I	S	R	I	S	R	P
41	P	N	P	N	N	N	P	P	P	(++)	(+++)	(++)	(++)	I	S	R	I	S	R	P
42	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+)	(+)	(+)	(++)	R	S	R	R	S	R	P
43	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(++)	(+++)	(++)	(+++)	R	R	I	I	S	R	P
44	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(++)	(+)	(+)	(+)	I	S	R	I	S	R	P
45	P	N	P	N	N	P	P	P	P	na	(+)	(++)	(++)	R	S	R	I	S	R	P
46	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(+)	(+)	(++)	(+)	R	S	R	I	S	R	P
47	P	N	P	N	N	N	P	P	P	(++)	(++)	(++)	(++)	I	S	R	R	S	R	P
48	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(++)	(++)	(+++)	(+++)	R	S	S	S	S	R	P
49	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	R	R	R	R	S	R	P
50	P	N	P	N	N	P	P	P	N	(+++)	(+)	(+)	(++)	R	S	R	I	S	R	P
51	P	N	P	N	N	P	N	N	N	(++)	(+++)	(++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	P
52	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(++)	(++)	(+)	I	S	R	R	S	R	P
53	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+)	(+)	na	(+)	R	S	R	R	S	R	P
54	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(+)	(++)	(++)	R	S	R	R	S	R	P
55	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	I	R	S	S	S	R	P
56	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(++)	(+)	(+)	(+)	R	S	R	R	S	R	P
57	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+++)	(++)	(+++)	(++)	I	S	R	S	S	R	P
58	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(++)	(++)	(++)	(+++)	I	S	R	R	S	R	P
59	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	I	I	R	S	S	R	P
60	P	N	P	N	N	P	P	N	P	(+)	(++)	(++)	(+++)	R	S	S	R	S	R	P
61	P	N	P	N	N	P	P	P	P	(+++)	(+)	(++)	(+)	R	S	R	I	S	R	P
62	P	N	P	N	N	P	P	N	N	(+)	(++)	(+++)	(+++)	I	S	S	I	S	R	P

