

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Gabrielle Limeira Genteluci

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE
Acinetobacter baumannii

Rio de Janeiro

2020

Gabrielle Limeira Genteluci

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE
Acinetobacter baumannii

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas
Karyne Rangel

Rio de Janeiro

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Genteluci, Gabrielle Limeira

Resistência a antimicrobianos e caracterização do biofilme de *Acinetobacter baumannii*. / Gabrielle Limeira Genteluci - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

136f. : fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Boas e Karyne Rangel.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. PFGE e MLST. 4. Heterorresistência e Resistência Adaptativa. 5. Biofilme.
I. Título.

Antimicrobial resistance and biofilm characterization of *Acinetobacter baumannii*.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Gabrielle Limeira Genteluci

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME
DE *Acinetobacter baumannii***

Tese apresentada ao curso de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 15/06/2020

BANCA EXAMINADORA

Verônica Viana Vieira (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Beatriz Meurer Moreira (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Bernadete Ferreira Teixeira Carvalho (Doutor)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

ORIENTADORAS

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Karyne Rangel Carvalho (Doutor)
Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Aos meus pais, Maria Alice Limeira Genteluci e Fernando Luiz Genteluci Martins, por todo o apoio, carinho e suporte dado em toda minha vida. Agradeço a toda minha família que sempre me incentivou e não mediu esforços para que eu alcançasse essa etapa em minha vida. Ao Paulo Marcos Gonçalves Filho, meu mais que amigo, companheiro, obrigado pelo carinho, pela paciência e apoio. Também agradeço as amigas que sempre me apoiaram, Carol, Raíza e Letícia por todos esses anos de amizade.

Obrigada aos amigos do Setor Saneantes! Agradeço aos membros dessa família: Carolaine, Camila, Amanda, Talita, Bruna, Gessi, Célia. Esse setor é repleto de companheirismo e apoio, obrigada por manterem este laboratório um ótimo ambiente de trabalho. Vocês são pessoas muito especiais, que levarei para o resto da vida!

Também agradeço ao grupo *Acinetobacter*, Verônica e Paula, especialmente à Daniela Betzler, por toda ajuda e apoio recebido durante todo o doutorado e também, pela compreensão, amizade, pelo companheirismo e carinho de vocês. Esse agradecimento se estende às minhas orientadoras Dr^a Maria Helena Simões Villas Bôas e Dr^a Karyne Rangel, pela paciência na orientação, apoio e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Sou muito grata pelos ensinamentos e conselhos durante toda a minha caminhada acadêmica.

Agradeço também ao auxílio da Dr. Verônica Viana por ceder o laboratório de taxonomia bacteriana e o material para as técnicas de PCR e sequenciamento de DNA. Além disso, a Talita por ser tão solícita em nos acompanhar durante os experimentos.

A todos da Central de Esterilização e do Setor de Meio de Cultura, pelas dicas e prontidão em ajudar, entregar os meios e materiais solicitados.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, a Fiocruz e a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, obrigada a todos que fizeram parte da minha vida e prestaram alguma ajuda para tornar este caminho mais fácil de ser percorrido.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno comumente associado a infecções relacionadas à assistência à saúde, sendo englobado na sigla "ESKAPE", como um dos patógenos multirresistentes (MDR) mais comuns e graves, com prioridade crítica para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos e a capacidade de sobreviver em superfícies estão entre os principais fatores responsáveis por sua persistência no ambiente hospitalar. Este estudo teve como objetivos confirmar a identificação de 76 isolados coletados de 2 hospitais do Rio de Janeiro no período de 2014 e 2015, avaliar a diversidade clonal das cepas por meio da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Além disso, determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiano, estudar a frequência de heterorresistência e a resistência adaptativa à polimixina B, pesquisar a presença dos genes codificadores de oxacilinas, da associação da sequência de inserção IS*Aba1* com o gene *bla*_{OXA-23} e do gene *mcr-1* por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. Por fim, detectar a capacidade dessas cepas na formação de biofilme em poliestireno, avaliar a natureza química do biofilme, o efeito do etanol em sua formação e visualizar o biofilme por microscopia de varredura confocal à laser (MVCL). A análise da sequência do gene *rpoB* confirmou a identificação de 72 cepas como *A. baumannii*. O PFGE revelou a presença de 2 pulsotipos prevalentes (A e B) dentre os 15 detectados, já o MLST detectou complexos clonais (CC) já descritos no Brasil, pelo esquema Oxford, três (CC103, CC231 e CC235) e pelo esquema Pasteur, quatro (CC1, CC15, CC162, CC213). Foram determinados dois novos STs, um pelo esquema Oxford (ST2097) e um pelo esquema Pasteur (ST1439). Além disso, a maioria das cepas de *A. baumannii* foi classificada como MDR ou extensivamente resistente (XDR) (62% e 35%, respectivamente), sendo revelados altos níveis de resistência a maioria dos antimicrobianos clinicamente disponíveis para o tratamento dessas infecções. Em contrapartida, as cepas foram mais suscetíveis aos antimicrobianos amicacina, gentamicina, minociclina e polimixina B. A heterorresistência foi verificada em 21 cepas e a resistência adaptativa não foi detectada. Por PCR, foi verificado que todas as cepas estudadas possuíam o gene *bla*_{OXA-51} e o *bla*_{OXA-23}, em uma cepa foi detectado o gene *bla*_{OXA-24}. Não houve detecção dos outros genes de oxacilinas e do *mcr-1*, e associação de IS*Aba1* – *bla*_{OXA-23} foi detectada em 4% das cepas. No presente estudo, 82% das cepas foram capazes de formar biofilme. Além disso, podemos sugerir que o biofilme formado pelas cepas formadoras de biofilme forte é predominantemente de natureza protéica. O etanol na concentração de 2% possuiu um efeito positivo na formação de biofilme. A visualização do biofilme por MVCL mostrou resultados condizentes com as classificações realizadas no estudo, tratamentos realizados e os efeitos do etanol a 2% na formação do biofilme. Devido à prevalência de infecções e surtos causados por *A. baumannii*, a compreensão dos mecanismos de resistência e do potencial patogênico deste micro-organismo são necessários para o entendimento da persistência no ambiente hospitalar. Além disso, fornecer recursos para melhorar o tratamento das infecções graves e aprimorar as medidas de controle e prevenção dessas infecções.

Palavras-chave: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. PFGE e MLST. 4. Heterorresistência e Resistência Adaptativa. 5. Biofilme.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a pathogen commonly associated with healthcare-related infections (HAI), being included in the "ESKAPE", as one of the most common and serious multiresistant (MDR) pathogen, and in the critical priority group for research and development of new antimicrobials. Antimicrobial resistance and the ability to survive on surfaces are among the main factors responsible for *A. baumannii* persistence in the hospital environment. The aimed of this study was to confirm the identification of 76 isolates from two hospitals in Rio de Janeiro between 2014 and 2015, evaluate clonal diversity of strains using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST). Moreover, determine the antimicrobials susceptibility profile, frequency of polymyxin B heteroresistance and adaptive resistance and investigate the presence of oxacillinase encoding genes, the IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} association and *mcr-1* gene using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing methods. Finally, we detected the ability of *A. baumannii* strains to form biofilm on a polystyrene surface, evaluated the biofilm composition and the effect of ethanol on the biofilm formation, and visualized *A. baumannii* biofilm using Confocal Laser Scanning Microscopy. The identification of 72 strains was confirmed by partial *rpoB* gene. PFGE revealed the presence of two prevalent pulsotypes (A and B) among the 15 described, while MLST detected clonal complexes (CC) already described in Brazil, by the Oxford scheme (CC103, CC231 and CC235) and by the Pasteur scheme (CC1, CC15, CC162, CC213). Two new STs were determined, one by the Oxford scheme (ST2097) and one by the Pasteur scheme (ST1439). In addition, most of *A. baumannii* strains was classified as MDR or extensively resistant (XDR) (62% and 35%, respectively), high levels of resistance being revealed to clinically available antimicrobials for the treatment of *A. baumannii* infections. However, studied strains were most susceptible to the antimicrobials amikacin, gentamicin, minocycline and polymyxin B. Heteroresistance was verified in 21 strains and adaptive resistance was not verified in any selected strain. By PCR, we verified that all strains had the *bla*_{OXA-51} gene and *bla*_{OXA-23}, in one strain the *bla*_{OXA-24} gene was detected. Other oxacillinase and *mcr-1* genes were not detected, and IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} association was detected in 4% of strains. We observed that 82% of the were able to form biofilm, in addition, we can suggest that the biofilm formed by strains that form strong biofilm is predominantly composed of protein. The 2% ethanol had a positive effect on *A. baumannii* biofilm formation. The visualization of the biofilm by confocal microscopy showed consistent results with the classifications performed in the study, treatments and the effects of 2% ethanol on the biofilm formation. Due to the prevalence of *A. baumannii* infections and outbreaks, an understanding of the resistance mechanisms and the pathogenic potential of this microorganism is necessary to understand the persistence in the hospital environment. In addition, provide resources to improve the treatment of serious infections and measures to control and prevent of these infections.

Keywords: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Resistance to antimicrobials. 3. PFGE and MLST. 4. Heteroresistance and Adaptive Resistance. 5. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição em porcentagem das 72 cepas de <i>A. baumannii</i> coletadas dos dois hospitais da rede pública do Rio de Janeiro.....	58
Figura 2	Dendrograma gerado pelas análises de DICE/UPGMA (Bionumerics versão 4.6, Applied Maths) das cepas de <i>A. baumannii</i> . Os padrões das bandas foram detectados por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição <i>ApaI</i>	58
Figura 3	Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no <i>software</i> Phyloviz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os <i>Sequence Types</i> (ST) de acordo com o esquema Oxford. Os Complexos Clonais (CC) e os STs observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores.....	61
Figura 4	Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no <i>software</i> Phyloviz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os <i>Sequence Types</i> (STs) de acordo com o esquema Pasteur. Os Complexos Clonais (CCs) e os STs observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores.....	62
Figura 5	Frequência de resistência aos antimicrobianos das 72 cepas de <i>A. baumannii</i>	64
Figura 6	Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B das 72 cepas de <i>A. baumannii</i>	64
Figura 7	Classificação das 72 cepas de <i>A. baumannii</i> quanto o tipo de formação de biofilme.....	70
Figura 8	Comparação da classificação do tipo de biofilme formado pelos das 17 cepas de <i>A. baumannii</i> após o tratamento do biofilme com metaperiodato de sódio (40 mM), DNase I (2 mg/mL) e proteinase K (1 mg/mL) por 2 h.....	72
Figura 9	Comparação da classificação do tipo de biofilme formado pelas 17 cepas de <i>A. baumannii</i> após o tratamento do biofilme com metaperiodato de sódio (40 mM), DNase I (2 mg/mL) e proteinase K (1 mg/mL) por 24 h.....	73

Figura 10	Classificação do biofilme das 41 cepas de <i>A. baumannii</i> selecionadas após serem submetidas ao tratamento com etanol 2% por 1 h.....	74
Figura 11	Microscopia confocal das cepas de <i>A. baumannii</i> 23SAN (biofilme forte; A), 120SAN (biofilme moderado; B), 136SAN (biofilme fraco; C) e 131SAN (não aderente; D) sem tratamento, em aumento de 20x.....	77
Figura 12	Microscopia confocal das cepas de <i>A. baumannii</i> 23SAN (A, aumento 63x) e 69SAN (B, aumento 20x) (biofilme forte). As setas indicam a formação de canais visualizados na microscopia.....	78
Figura 13	Microscopia confocal da cepa de <i>A. baumannii</i> 69SAN sem tratamento (A) e após tratamento com metaperiodato de sódio por 2 h (B), metaperiodato de sódio por 24 h (C), DNase I por 2 h (D), DNase I por 24 h (E), proteinase K por 2 h (F), proteinase K por 24 h (G), em aumento de 20x.....	79
Figura 14	Microscopia confocal da cepa de <i>A. baumannii</i> 171SAN sem tratamento (A) e após adição de etanol 2% por 1 h em aumento de 20x.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação do complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> (Acb) e espécies relacionadas (MURRAY et al, 2010).....	43
Tabela 2 -	Sequências nucleotídicas e temperaturas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes utilizados na técnica de <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) de acordo com o esquema Oxford.....	47
Tabela 3 -	Sequências nucleotídicas e temperaturas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes utilizados na técnica de <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) de acordo com o esquema Pasteur.....	47
Tabela 4 -	Classe dos antimicrobianos testados na avaliação da suscetibilidade das cepas de <i>A. baumannii</i>	49
Tabela 5 -	Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....	52
Tabela 6 -	<i>Sequence typings</i> (STs) das cepas de <i>A. baumannii</i> segundo os esquemas Pasteur e Oxford e a relação com os pulsotipos identificados pelo Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	63
Tabela 7 -	Perfis de resistência aos antimicrobianos com o respectivo número de cepas de <i>A. baumannii</i>	65
Tabela 8 -	Tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), sítio de coleta, perfil de resistência e análise populacional das cepas de <i>A. baumannii</i> com heterresistência à polimixina B.....	68
Tabela 9 -	Resultado do tratamento do biofilme de <i>A. baumannii</i> com proteinase K (1 mg/mL), DNase I (2 mg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM) por 2 h.....	71
Tabela 10 -	Resultado do tratamento do biofilme de <i>A. baumannii</i> com proteinase K (1 mg/mL), DNase I (2 mg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM) por 24 h.....	72
Tabela 11 -	Efeito do etanol na concentração de 2% sobre o tipo de biofilme formado pelas cepas de <i>A. baumannii</i>	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

16S rRNA	Subunidade 16S do cido Ribonucleico Ribossmico
AAC	Acetiltransferases
Acb	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus–baumannii</i>
ADC	Cefalosporinase Derivada de <i>Acinetobacter</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i>
AMH	Agar Mueller-Hinton
AN	Agar Nutriente
ANT	Nucleotidiltransferases
APH	fosfotransferases
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
Bap	Proteína Associada ao Biofilme
CC	Complexo Clonal
CCBH	Coleo de Cultura de Bactérias de Origem Hospitalar
CI	Clones Internacionais
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMHCA	Mueller-Hinton Cátion Ajustado
DNA	cido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ptica
eDNA	DNA extracelular
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-acético
EMA	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
EPS	Exopolissacardeo
ESL	β -lactamases de Espectro Estendido
GTP	Guanosina Trifosfato
IAA	cido Indol-3-acético
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRAS	Infecees Relacionadas  Assistência  Saúde
LB	Caldo Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo

MATE	<i>Multi-antimicrobial extrusion protein</i>
MDR	Multirresistente
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MVCL	Microscopia de Varredura Confocal à Laser
MβL	Metallo-β-lactamases
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM-1	New Delhi Metallo-β-lactamase-1
NH ₂	Amino
n-MDR	Não-multirresistentes
OH	Hidroxila
OmpA	Proteína de Membrana Externa A
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinas
PABA	Ácido Para-aminobenzoico
PAP	Perfil de Análise Populacional
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDR	Panrresistente
PEtN	Fosfoetanolamina
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PLP	Proteínas de Ligação à Penicilina
PNAG	Poli-β-1,6-N-acetilglicosamina
QS	<i>Quorum sensing</i>
RMT	16S rRNA Metiltransferases
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i>
SI	Sequência de Inserção
ST	<i>Sequence type</i>
TSB	Caldo Triptona de Soja
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VME	Vesículas de Membrana Externa
XDR	Extensivamente Resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.2	Importância clínica e patogenicidade	16
1.3	Tipagem molecular e diversidade genética	18
1.3.1	Eletroforese em gel de campo pulsado.....	18
1.3.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i>	19
1.4	Fatores de virulência	20
1.5	Mecanismos de resistência a antimicrobianos	23
1.5.1	β -lactâmicos.....	24
1.5.2	Aminoglicosídeos.....	26
1.5.3	Fluoroquinolonas.....	27
1.5.4	Inibidores da via do folato.....	28
1.5.5	Tetraciclinas.....	29
1.5.6	Lipopeptídeos.....	30
1.6	Heterorresistência e resistência adaptativa às polimixinas	32
1.7	Formação de biofilme	34
1.7.1	Fatores envolvidos na formação de biofilme de <i>A. baumannii</i>	36
1.7.2	Efeito do etanol na formação de biofilme de <i>A. baumannii</i>	38
1.8	Relevância e justificativa	40
2	OBJETIVO	42
2.1	Objetivo geral	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	METODOLOGIA	43

3.1	Isolados bacterianos.....	43
3.2	Confirmação da identificação dos isolados.....	43
3.3	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	44
3.4	Obtenção do ácido desoxirribonucleico genômico (DNA).....	45
3.5	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	45
3.6	Sequenciamento genético.....	46
3.6.1	Purificação do produto da PCR.....	46
3.6.2	Determinação das sequências nucleotídicas.....	46
3.7	Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos.....	48
3.7.1	Método de disco-difusão em agar.....	48
3.7.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	48
3.8	Determinação dos fenótipos de resistência à polimixina B.....	50
3.8.1	Avaliação da heterorresistência.....	50
3.8.2	Avaliação da resistência adaptativa.....	50
3.9	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	51
3.10	Estudo da formação de biofilme.....	53
3.11	Estudo da natureza do biofilme.....	53
3.12	Avaliação dos efeitos de etanol na formação de biofilme.....	54
3.13	Microscopia de Varredura Confocal à Laser (MVCL).....	54
3.14	Análise estatística.....	55
3.15	Aspectos éticos.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Confirmação da identificação das cepas.....	57
4.2	Distribuição das cepas.....	57

4.3	Avaliação do polimorfismo genético por PFGE.....	57
4.4	Tipagem por MLST.....	59
4.5	Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos.....	63
4.6	Análise do perfil populacional (PAP).....	66
4.7	Pesquisa de genes de oxacilinas, sequência de inserção e do gene <i>mcr-1</i> .	69
4.8	Ensaio de formação de biofilme.....	69
4.9	Avaliação da natureza do biofilme de <i>A. baumannii</i>	70
4.10	Avaliação do efeito do etanol no biofilme de <i>A. baumannii</i>	72
4.11	Análise do biofilme por MVCL.....	75
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	96
	APÊNDICE A - TABELA DAS CEPAS INCLUÍDAS NO ESTUDO COM O NÚMERO DA CEPA, ORIGEM, SÍTIO DE COLETA, TIPAGEM POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE), AVALIAÇÃO DA HETERORRESISTÊNCIA E BIOFILME.....	127
	APÊNDICE B - TABELA DAS CEPAS INCLUÍDAS NO ESTUDO COM O NÚMERO DA CEPA, RESULTADOS DO ANTIBIOGRAMA E DA PESQUISA DE <i>bla_{OXA}</i> E DA ASSOCIAÇÃO DE <i>ISAb_{a1}</i> E <i>bla_{OXA-23}</i>	128
	APÊNDICE C – MANUSCRITO ACEITO E PUBLICADO NA REVISTA <i>Current Microbiology</i>	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Acinetobacter baumannii*

Micro-organismos do gênero *Acinetobacter* são cocobacilos Gram-negativos, não-fermentadores e da família Moraxellaceae. De acordo com a taxonomia atual, o gênero *Acinetobacter* possui mais de 50 espécies válidas (LPSN, 2020). Apesar da maioria das espécies de *Acinetobacter* ser considerada não patogênica, algumas são importantes patógenos para o homem. As espécies clinicamente mais relevantes do gênero *Acinetobacter* pertencem ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* (Acb) (TOUCHON et al., 2014). Esse complexo consiste em cinco espécies patogênicas: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijkschoorniae*, e uma espécie não patogênica *Acinetobacter calcoaceticus*. A espécie de maior importância clínica e mais bem caracterizada é *A. baumannii*. Porém a sua inclusão em um complexo se deve à incapacidade de distinção fenotípica de *A. baumannii* de outros membros do complexo Acb (BOUVET; GRIMONT, 1986, NEMEC et al., 2011, NEMEC et al., 2015, COSGAYA et al., 2016).

A identificação em nível de espécie dentro do gênero *Acinetobacter* é muitas vezes problemática. Atualmente as espécies de *Acinetobacter* são identificadas por métodos moleculares (KARAH et al., 2011, AHMED; ALP, 2015), dentre eles, o sequenciamento do gene codificador da subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossômico (16S rRNA), sendo esse um dos mais utilizados para identificação bacteriana (CUSTOVIC et al., 2014). Porém a principal limitação para sua utilização em *Acinetobacter* se deve ao fato desse gene ser tão conservado, que muitas vezes não possibilita diferenciar todas as espécies (ALVAREZ-BUYLLA; CULEBRAS; PICAZO, 2012).

Por isso outros genes têm sido utilizados para a identificação de isolados de *Acinetobacter* spp., incluindo os genes *ompA*, *recA*, *gyrB* e *rpoB* (GUNDI et al., 2009, KARAH et al., 2011, McCONNELL et al., 2012, WANG et al., 2014, NAJAR PEERAYEH; KARMOSTAJI, 2015). A caracterização molecular utilizando pesquisa por PCR do gene codificador da oxacilinase do tipo *bla_{OXA-51}*, juntamente com o sequenciamento do gene *rpoB*, tem alto poder discriminatório sobre os métodos convencionais para identificação de espécies de *Acinetobacter*, especialmente dentro do complexo ACB (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

Além desses, também existem métodos automatizados para identificação das espécies de *Acinetobacter* como Vitek 2 e a *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF) (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019). A utilização dessas metodologias para identificação de espécies do complexo ACB é problemática, isso pode ser explicado em parte pelo conteúdo limitado do banco de dados (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019). No entanto, se houver a incorporação de espectros de massa mais diversificados de diferentes espécies do complexo ACB melhorará o banco de dados do MALDI-TOF, que conseqüentemente será útil na identificação precisa de *Acinetobacter* a nível de espécie (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

A. baumannii é onipresente na natureza, conseqüentemente pode ser isolado de amostras de água, de animais, e de solo, por conta disso é difícil identificar seu habitat natural. No ambiente hospitalar, *A. baumannii* é isolado principalmente de equipamentos médicos, profissionais da área de saúde e pacientes hospitalizados. Em geral essas cepas são mais resistentes aos antimicrobianos e as infecções causadas por elas possuem maior taxa de mortalidade entre os pacientes em comparação com infecções causadas por outras espécies de *Acinetobacter* (CHUANG et al., 2011).

Cepas de *A. baumannii* são encontradas frequentemente em unidades de tratamento intensivos (UTI) e enfermarias cirúrgicas, por serem, em geral, mais resistentes aos antimicrobianos que outras espécies de importância hospitalar, podendo persistir e se propagar nesses locais onde a pressão seletiva dos antimicrobianos favorece o aparecimento de bactérias resistentes (BIENDO et al., 1999, VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDE, 2007). O contato com os profissionais envolvidos com cuidados da saúde, previamente expostos ao micro-organismo ou com pacientes colonizados, também pode ser um meio de propagação de *A. baumannii* no ambiente hospitalar (MARAGAKIS et al., 2004, CRNICH.; SAFDAR; MAKI, 2005, DIKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007, ASENSIO et al., 2008, RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2009). Entre os isolados do gênero *Acinetobacter*, *A. baumannii* é capaz de sobreviver por mais tempo na superfície dos dedos, o que poderia explicar as altas taxas de contaminação cruzada nosocomial, principal modo de transmissão desse micro-organismo (HOUANG et al., 1998), sendo de crucial relevância prevenir esse tipo de transmissão (D'AGATA; THAYER; SCHAFFNER, 2000).

1.2 Importância clínica e patogenicidade

A. baumannii é um patógeno oportunista capaz de causar uma ampla gama de infecções. Dentre as infecções causadas por esse micro-organismo podemos citar pneumonias (hospitalar ou adquirida na comunidade), bacteremias, endocardites, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário e meningites (BERGOGNE-BÉREZIN; TOWNER, 1996, ROCA et al., 2012, McCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013).

Essas infecções são mais comuns em pacientes que sofrem de doença subjacente ou que tenham sido submetidos a grandes procedimentos cirúrgicos. Além disso, estão associadas principalmente a longos períodos de hospitalização (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008), sexo masculino, idade avançada, alcoolismo, tabagismo pesado, diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica e doença renal (WISPLINGHOFF; PERBIX; SEIFERT, 1999, FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007). Pneumonia hospitalar representa a manifestação clínica mais comum da infecção causada por *A. baumannii* e ocorre normalmente em pacientes que receberam ventilação mecânica na UTI. Essa infecção pode ocorrer após colonização das vias respiratórias por exposição ambiental (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

As infecções da corrente sanguínea causadas por *A. baumannii* são também uma das causas mais comuns de infecções em UTI (WISPLINGHOFF et al., 2004). As fontes dessas infecções são dispositivos intravasculares, além de infecções prévias do trato respiratório inferior (CISNEROS et al., 1996, JANG et al., 2009, JUNG et al., 2010), pele e trato urinário (SEIFERT et al., 1993).

A. baumannii também pode causar infecções em pacientes que apresentam queimaduras. Alguns estudos relataram alta incidência de infecção causada por esse patógeno em unidades de queimados e ressaltaram a importância de *A. baumannii* nesta população de doentes (ALBRECHT et al., 2006, CHIM; TAN; SONG, 2007, KEEN et al., 2010). Esse tipo de infecção pode ser especialmente problemático uma vez que pode atrasar a cura da ferida, evoluir para infecções de tecidos subjacentes e conseqüentemente infecções da corrente sanguínea (LYYTIKÄINEN et al., 1995, ROBERTS; FINDLAY; LANG, 2001, TROTTIER et al., 2007, KEEN et al., 2010). *A. baumannii* já foi relatado em infecções de sítio cirúrgico em algumas instituições, como infecções de pele, tecidos moles e ortopédicas no ambiente de UTI (CISNEROS et al., 1996, SADER et al., 2001, RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2004, GAYNES; EDWARDS, 2005, HELAL et al., 2015).

Apesar de serem raras, meningites causadas por *A. baumannii* têm sido cada vez mais relatadas, tendo a maioria dos casos ocorrido em pacientes em recuperação de procedimentos

neurocirúrgicos (PARAMYTHIOTOU et al., 2007, SAÇAR et al., 2007, RODRÍGUEZ GUARDADO et al., 2008, KROL; HAMID; CUNHA, 2009, CASCIO et al., 2010).

Além das infecções anteriormente mencionadas, *A. baumannii* é uma causa frequente de endocardite. Relatos de casos individuais têm descrito endocardites associadas a próteses valvulares (OLUT; ERKEK, 2005, MENON et al., 2006, KUMAR; VENGADASSALAPATHY; MENON, 2008) e cateter intravascular (BHAGAN-BRUNO; LATHER; FERGUS, 2010).

As infecções de *A. baumannii* também já foram associadas a lesões adquiridas em áreas de conflito, por exemplo, no Iraque e no Afeganistão (JOLY-GUILLOU, 2005, MURRAY et al., 2006, JOHNSON; MARCONI; SCOTT, 2007, SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008), em sobreviventes após catástrofes naturais, como no terremoto de Marmara na Turquia (CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION, 2004) e no tsunami do Sudeste Asiático que ocorreu em dezembro de 2004 (GARZONI et al., 2005, MAEGELE et al., 2005). Há evidências de que o uso da morfina no campo de batalha ou em lesões mais graves pode aumentar os riscos de infecções por *A. baumannii*, talvez por conta do efeito imunossupressor dessa substância. No entanto, esses surtos também podem ocorrer por conta de falhas nas precauções de controle de infecção e propagação epidêmica de *A. baumannii*, um reflexo da extrema pressão que as unidades de emergência dos hospitais sofrem nessas situações (BRESLOW et al., 2011).

Infecções da pele e tecidos moles relacionados com lesões de guerra podem produzir celulite e fasciíte necrosante, que exigem desbridamento cirúrgico e antibioticoterapia (SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008). Um estudo pesquisou a fonte da infecção desses militares e os resultados sugeriram que eram as instalações de tratamento militares (SCOTT, 2007). No entanto, outros estudos avaliaram que a colonização da pele também podia ser uma fonte de infecção (GRIFFITH et al., 2006, DOI et al., 2010).

Embora menos frequentes, *A. baumannii* também pode causar infecções adquiridas na comunidade, como pneumonia (85% dos relatos de infecções comunitárias causadas por *A. baumannii*), bacteremia, infecções de pele, tecidos moles e infecções oculares e meningite secundária (CHANG et al., 2000, FALAGAS et al., 2007, DEXTER et al., 2015). Pneumonias adquiridas na comunidade causadas por *A. baumannii* são mais graves do que pneumonias nosocomiais por serem geralmente fulminantes (morte dentro de oito dias de diagnóstico) e a taxa de mortalidade chegar a 60% (FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007, SEROTA et al., 2018). A maioria dos relatos de pneumonia adquirida na comunidade ocorre durante os meses de verão em climas tropicais e subtropicais, sendo frequentemente associados com fatores do

hospedeiro tais como o abuso de álcool ou doença pulmonar obstrutiva crônica (FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007).

1.3 Tipagem molecular e diversidade genética

Os métodos de tipagem molecular ou genotipagem são utilizados na discriminação entre as cepas e se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico. Elas auxiliam a atuação da vigilância epidemiológica, na identificação e controle de surtos, além de facilitarem a compreensão do aumento da resistência aos antimicrobianos e da propagação de *A. baumannii* nos hospitais, através da identificação dos potenciais reservatórios e seu modo de transmissão (TOWNER, 2009). Por outro lado, a técnica a ser utilizada no estudo depende da abordagem, do ambiente de laboratório e do apoio financeiro disponível, já que não existe método absoluto de tipagem molecular.

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) são os métodos de tipagem molecular mais utilizados na investigação de surtos de *A. baumannii* (MITSUDA, 2012, TOMASCHEK et al., 2016). O PFGE é mais utilizado localmente e o MLST tem sido utilizado para estudar cepas de surtos disseminados internacionalmente.

1.3.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

O PFGE é um dos métodos mais comumente utilizados para a genotipagem. Ele consiste no emblocamento do DNA total das cepas em agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição (SEIFERT; GERNER-SMIDT, 1995, SEIFERT et al., 2005). Por esse método, após a análise do padrão das bandas gerado por eletroforese, uma cepa é considerada indistinguível quando não houver diferença entre o padrão de bandas, indistinguíveis, quando não possuírem diferenças no padrão de bandas, relacionadas quando o possuírem o número de bandas distintas menor ou igual a seis e distintas quando a diferença do padrão de bandas for maior que sete (TENOVER et al., 1995). Outra forma de análise da similaridade entre cepas foi descrita por Seifert et al. (2005), que permite que as cepas sejam classificadas como: indistinguíveis, quando possuírem porcentagem de similaridade genética maior que 85%; ou distintos, quando essa porcentagem for menor que 85%.

Foi verificado, através da técnica de PFGE, que três pulsotipos de *A. baumannii* predominam em muitos países europeus desde a década de 1990 (ADAMS-HADUCH et al.,

2011, LOWINGS et al., 2015). Já foi demonstrada também a propagação de pulsotipos epidêmicos de *Acinetobacter* entre o Brasil e a Argentina (GALES et al., 2001). No Brasil, estudos realizados na cidade do Rio de Janeiro, mostraram a presença de dois pulsotipos prevalentes, sendo um deles disseminado em hospitais do município (CARVALHO et al., 2009, GENTELUCI et al., 2020).

1.3.2 *Multilocus Sequence Typing*

O MLST é uma excelente ferramenta para estudos da estrutura da população e para estudos em longo prazo da epidemiologia de *A. baumannii*, além de ser mais confiável. No entanto, ainda é uma técnica cara que necessita de uma equipe bem treinada e laboratórios de qualidade (AHMED; ALP, 2015).

Essa técnica se baseia na amplificação de sete genes conservados do genoma, seguida de sequenciamento. O número do alelo é fornecido para cada sequência resultante da amplificação de cada um dos sete genes e a combinação de todos os números de alelos gera o *sequence type* (ST) (MAIDEN et al., 1998, BARTUAL et al., 2005), que pode ser comparado com os já descritos no banco de dados disponível no *site* <http://www.pubmlst.org/a.baumannii>.

Dois esquemas MLST foram desenvolvidos para *A. baumannii*. O primeiro foi desenvolvido por Bartual et al. (esquema Oxford) (BARTUAL et al., 2005) e um segundo esquema foi desenvolvido pelo Instituto Pasteur (esquema Pasteur) (DIANCOURT et al., 2010). Ambos os esquemas trabalham com sete genes conservados e possuem três genes em comum: *gltA*, *recA* e *cpn60*. Porém estudos mostraram que em comparação ao esquema Pasteur, o esquema Oxford possui maior poder discriminatório e isso pode levantar a questão se esse esquema poderia mesmo realizar uma boa tipagem. Esse alto poder discriminatório do esquema Oxford ocorre por conta da alta variabilidade dos genes *gpi* e *gyrB* presentes nesse esquema (PARK et al., 2009, HAMOUDA et al., 2010, TOMASCHEK et al., 2016). Por esses genes não estarem incluídos no protocolo do esquema Pasteur é possível sugerir que o esquema Pasteur possibilita uma maior exatidão nos resultados (TOMASCHEK et al., 2016).

São descritos 18 clones espalhados em mais de um continente, entre estes, seis complexos clonais (CC) foram relatados com maior frequência: 1/109, 2/118, 79/113, 3/187, 15/103 e 25/110, onde os números que representam os CC foram atribuídos pelas plataformas dos esquemas Pasteur/Oxford (KARAH et al., 2012). CC1, 2 e 3 tem predominado em diversos países da Europa desde 1990 e por isso são considerados os três clones epidêmicos

de *A. baumannii* (DIJKSHOORN et al., 1996). Esses CC são considerados clones internacionais (CI) e são responsáveis por surtos hospitalares em todo o mundo (VAN DESSEL et al., 2004, NEMEC et al., 2008, HIGGINS et al., 2010, MUGNIER et al., 2010, CARRETTO et al., 2011, MINANDRI et al., 2012, SUNG et al., 2012, KANAMORI et al., 2015). Além desses, ainda são descritos outros CI, como CI4, CI5 e CI6 que também corroboram com a alta capacidade de disseminação e persistência de *A. baumannii* globalmente (CALDART et al., 2019).

Diferente do panorama internacional, no Brasil, a maioria das cepas têm sido associada com os complexos clonais CC1/109, CC15/103, CC25/110 e CC79/113 (CLÍMACO et al., 2013, COELHO-SOUZA et al., 2013, MARTINS et al., 2013a, MARTINS et al., 2013b, CHAGAS et al., 2014). No Rio de Janeiro também já foi relatada a predominância desses quatro CC entre cepas de *A. baumannii* coletados de pacientes colonizados ou com infecção por *A. baumannii* (MARTINS et al., 2013a).

A multirresistência de *A. baumannii*, principalmente a disseminação de cepas resistentes aos carbapenemas, é considerado um fenômeno clonal (CAI et al., 2012, KARAH et al., 2012, ZARRILLI et al., 2013). Um estudo com cepas resistentes a esses antimicrobianos, coletadas em vários países nos anos 2000, mostrou predominância principalmente do CC2, indicando sua importante contribuição para a propagação internacional de cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas (HIGGINS et al., 2010). No Brasil, estudos mostraram que CC15/103 e CC79/113 são os principais CC responsáveis pela propagação do gene *bla_{OXA-23}* em distintas regiões (GROSSO et al., 2011, CHAGAS et al., 2014, VASCONCELOS et al., 2015). Sendo que ST79 (CC79/113) pode ter sido responsável pela propagação do gene *bla_{OXA-23}* na América do Sul, já que esse ST foi encontrado também em cepas de *A. baumannii* formadores de OXA-23 na Argentina (STIETZ et al., 2013).

1.4 Fatores de virulência

Comparado a outros patógenos Gram-negativos de importância médica, poucos fatores de virulência já foram identificados em *A. baumannii*. Os estudos tentam esclarecer a forma como este patógeno persiste no meio ambiente, interage e causa danos às células hospedeiras.

O fator de virulência de *A. baumannii* melhor caracterizado é a proteína de membrana externa A (OmpA). A OmpA contribui diretamente na virulência de *A. baumannii*, já que é capaz de se ligar a mitocôndria e induzir apoptose através da liberação de moléculas pró-

apoptóticas, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose. Este fator de virulência potente pode ser o mecanismo pelo qual *A. baumannii* induz danos nas células respiratórias humanas durante a infecção (JACOBS et al., 2010) e pode ajudar a colonização nos estágios iniciais de uma infecção por *A. baumannii*. Isso porque, essa proteína desempenha um papel na adesão e invasão de células epiteliais, e ainda contribui para a disseminação de *A. baumannii* na infecção. Um estudo observou que cepas deficientes de OmpA são recuperados em menor quantidade do sangue de camundongos, indicando assim a importância desse fator de virulência na patogênese de *A. baumannii* (CHOI et al., 2008). A proteína OmpA também contribui para a capacidade de *A. baumannii* persistir e crescer em soro humano, uma vez que foi demonstrado que ela interage com inibidores solúveis da via alternativa do complemento e evita que as bactérias morram por esse mecanismo (KIM et al., 2009). Por fim, essa proteína também pode facilitar a persistência e sobrevivência de *A. baumannii*, diminuindo sua motilidade em superfície e auxiliando na formação de biofilme (GADDY; ACTIS, 2009, CLEMMER; BONOMO; RATHER, 2011).

O papel do lipopolissacarídeo (LPS) na patogênese de *A. baumannii* foi investigado utilizando uma cepa deficiente em LPS. Este mutante apresentou uma redução da resistência ao soro normal humano e menor sobrevivência durante a infecção experimental de tecido mole em rato, indicando um importante papel do LPS na patogênese desse micro-organismo (LUKE et al., 2010). Além disso, sugere-se que o LPS também seja capaz de ativar a resposta imune inata e exacerbar a resposta inflamatória (KNAPP et al., 2006).

Além do LPS, o polissacarídeo capsular também foi identificado como um fator de virulência de *A. baumannii*. Ele parece desempenhar um papel importante na proteção das bactérias da resposta imune inata do hospedeiro, já que cepas deficientes na produção de cápsula mostraram diminuição do crescimento no soro humano. Além disso, essas cepas deficientes não foram capazes de causar a progressão da infecção em um modelo experimental realizado em ratos (RUSSO et al., 2011).

As fosfolipases são enzimas lipolíticas bacterianas que catalisam a clivagem de fosfolípidos e podem contribuir para a patogênese de bactérias Gram-negativas. São capazes de auxiliar a lise de células hospedeiras, por meio da clivagem de fosfolípidos presentes na membrana celular do hospedeiro, auxiliar a degradação das barreiras das mucosas e consequentemente facilitar a invasão bacteriana. O nocaute de um dos genes de fosfolipase D de *A. baumannii* resultou em uma diminuição na sobrevivência desse micro-organismo no soro e na sua capacidade de invadir células epiteliais (JACOBS et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que essa proteína auxilia na disseminação de *A. baumannii* e na capacidade

desse micro-organismo induzir morte celular (CAMARENA et al., 2010, JACOBS et al., 2010). Também já foi demonstrado que as fosfolipases secretadas a partir da célula bacteriana, são encontradas em sobrenadantes de cultura de diferentes cepas de *A. baumannii*, onde podem ter algum tipo de ação a distância (ANTUNES et al., 2011).

As proteínas de ligação à penicilina (PLP) são mais comumente associadas com a ligação e inativação de β -lactâmicos, mas também participam nas etapas finais da biossíntese da camada de peptidoglicano e contribuem para a estabilidade da célula bacteriana (SAUVAGE et al., 2008). Foi observado que cepas deficientes em PLP tem o *fitness* reduzido em condições similares as encontradas no processo infeccioso (RUSSO et al., 2011).

As vesículas de membrana externa (VME) são secretadas a partir da membrana externa de várias bactérias Gram-negativas e são capazes de transportar fatores de virulência, facilitar a transferência horizontal de genes e proteger as bactérias da resposta imunológica do hospedeiro (ELLIS; KUEHN, 2010). Em *A. baumannii*, as VME são capazes de transportar a OmpA para o interior de células eucarióticas e induzir a morte celular (JIN et al., 2011). Também são capazes de facilitar a transferência horizontal do gene *bla*_{OXA-24}, indicando que elas também podem desempenhar um papel na disseminação de resistência a antimicrobianos em *A. baumannii* (RUMBO et al., 2011).

Além dos fatores de virulência mais comumente relacionados com *A. baumannii*, esse micro-organismo ainda possui várias características que podem auxiliar na sua patogênese. A proteção conferida pela membrana externa, expressão constitutiva de sistemas de bombas de efluxo e a expressão reduzida de porinas na membrana externa, podem diminuir significativamente a permeabilidade a agentes antimicrobianos, e conseqüentemente tornar esse micro-organismo intrinsecamente resistente a diferentes antimicrobianos (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDE, 2007). Cepas multirresistentes (MDR) possuem em seu genoma, ilhas de resistência que são constituídas por um conjunto de genes que codificam resistência a antimicrobianos e metais pesados, bombas de efluxo de resistência a múltiplos antimicrobianos e resistência a desinfetantes à base de quaternários de amônio (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDE, 2007). Além disso, *A. baumannii* geralmente é um transmissor de novas β -lactamases, já que a maioria das carbapenemases do tipo oxacilinas (OXA) foi isolada primeiramente desse micro-organismo (QUEENAN, BUSH, 2007). A ampla aquisição dessas enzimas permite que algumas dessas cepas possuam resistência a todos os antimicrobianos conhecidos, incluindo imipenem e polimixina E (colistina) (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDE, 2007).

1.5 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

A. baumannii é uma causa comum de infecções nosocomiais, sendo altamente resistente à maioria dos antimicrobianos disponíveis na prática clínica, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. No entanto, ainda existem discussões sobre as definições dos termos multirresistentes (MDR), extensivamente resistente (XDR) e panresistente (PDR). Segundo Magiorakos et al. (2012), uma cepa MDR é aquela resistente a pelo menos um antimicrobiano em mais de três classes de antimicrobianos; uma cepa XDR é aquela resistente a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes de antimicrobianos, com exceção de duas ou menos classes; e uma cepa PDR é aquela que é resistente a todos os agentes antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

A capacidade de *A. baumannii* adquirir mecanismos de resistência a antimicrobianos facilita a persistência desse micro-organismo em ambientes hospitalares e a emergência global de cepas MDR ou até mesmo PDR (TACCONE et al., 2006, VALENCIA et al., 2009). Vários mecanismos de resistência a antimicrobianos são descritos em *A. baumannii*, dentre eles, β -lactamases, bombas de efluxo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA), alterações de permeabilidade e de locais-alvo (GORDON; WAREHAM, 2010, ESTERLY et al., 2011, ROCA et al., 2012). Cada mecanismo pode ter como alvo, diferentes classes de antimicrobianos ou vários mecanismos diferentes podem atuar em conjunto para conferir resistência a uma única classe de antimicrobianos (POIREL; NORDMANN, 2006).

A propagação desses mecanismos em *A. baumannii* ocorre principalmente através de plasmídeos conjugativos, aquisição de transposons ou mobilização de integrons, essas estruturas genéticas podem transferir vários genes que codificam resistência a diferentes classes de antimicrobianos (ESTERLY et al., 2011). Além disso, as sequências de inserção (SI) funcionais também são importantes por conferir plasticidade ao genoma desses micro-organismos e amplificar a resistência antimicrobiana, já que podem aumentar a expressão de genes que codificam mecanismos de resistência (CHEN et al., 2008, MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009, RAVASI et al., 2011).

Estudos de vigilância demonstraram que o aumento da resistência antimicrobiana de *A. baumannii* têm se tornado cada vez mais uma questão importante (TURNER; GREENHALGH, 2003, TOGNIM et al., 2004, LANDMAN et al., 2007, XIE et al., 2018), porém ainda não se sabe se a multirresistência é um fator de risco para mortalidade elevada em infecções causadas por *A. baumannii*. Alguns estudos relataram que as pneumonias ou infecções da corrente sanguínea causadas por *A. baumannii* MDR não estão relacionadas com

o aumento no tempo de internação ou aumento da mortalidade (MAI et al., 2007, CHOPRA et al., 2013). Porém, contrariamente, outros estudos mostraram a relação positiva das infecções causadas por *A. baumannii* MDR com maiores taxas de mortalidade e aumento dos custos hospitalares (SUNENSHINE et al., 2007, GISKE et al., 2008, SHENG et al., 2010).

1.5.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos possuem boa atividade e baixa toxicidade (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Neste grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemas e os monobactâmicos, sendo todos portadores de um anel β -lactâmico (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). Esses antimicrobianos entram nas células bacterianas através de porinas, interferindo na síntese da parede celular bacteriana, conseqüentemente, afetando o crescimento e desenvolvimento das células bacterianas (GOODMAN; GILMAN, 2006, KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010).

As β -lactamases são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico que está presente nesses antimicrobianos (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). Essas enzimas são classificadas em dois principais sistemas de classificação, de Ambler (baseado em classificação molecular) e de Bush-Jacoby-Medeiros, que classifica as β -lactamases mais importantes clinicamente, como as produzidas por bactérias Gram-negativas (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

As enzimas da classe A de Ambler são as penicilinases, cefalosporinases, β -lactamases de amplo espectro, β -lactamases de espectro estendido (ES β L) e carbapenemases. São capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e carbapenemas. As enzimas da classe A, podem ser inibidas por inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam (NAAS et al., 2007, NAAS; NORDMANN; HEIDT, 2007). Essa classe contém uma série de enzimas significativas, porém apenas a ES β L do tipo CTX-M já foi identificada em *A. baumannii* (FARAJNIA et al., 2013, OPAZO et al., 2014).

As enzimas da classe B de Ambler ou enzimas do grupo três como são classificadas pelo sistema Bush-Jacoby-Medeiros, incluem metalo- β -lactamases (M β L), que exigem Zn²⁺ como co-fator. Hidrolisam eficientemente β -lactâmicos, inclusive carbapenemas, mas não aztreonam, e são inibidas por agentes quelantes, como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os genes que codificam M β L são encontrados em plasmídeos, por conta disso são facilmente transferidos entre as bactérias. As M β L mais comuns são imipenemase M β L

(IMP), Verona integron codificado M β L (VIM), Seoul imipenemase (SIM) e New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) (LEE et al., 2005, PASTERÁN et al., 2006, NAAS; NORDMANN; HEIDT, 2007). As M β L dos tipos IMP e VIM são comumente encontradas em *A. baumannii* (NAAS; NORDMANN; HEIDT, 2007, AL-HASSAN; EL MAHALLAWY; AMYES, 2013).

A classe C de Ambler é constituída por várias enzimas importantes, incluindo penicilinase e cefalosporinase, como a AmpC β -lactamase. Cromossomicamente codificadas, as enzimas AmpC são capazes de inativar aztreonam, todas as penicilinas e a maioria das cefalosporinas. Não são inibidas pela maioria dos inibidores de β -lactamases, exceto avibactam (BUSH; JACOBY, 2010, BONNIN et al., 2011). Espécies de *Acinetobacter* produzem intrinsecamente uma cefalosporinase do tipo AmpC também conhecida como cefalosporinase derivada de *Acinetobacter* (ADC) (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010). As ADC, quando expressas em um nível basal, não reduzem a eficácia das cefalosporinas de espectro expandido, porém na presença de uma SI como IS*Aba*1 (HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006, RUIZ et al., 2007), ocorre o aumento da expressão do gene *ampC* e consequentemente a resistência desses micro-organismos às cefalosporinas de espectro estendido (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Entre as enzimas da classe D de Ambler, que são classificadas como grupo dois pelo sistema Bush-Jacoby-Medeiros, podemos citar as OXA. Até o momento, mais de 150 variantes distintas dessas enzimas já foram descritas, contudo apenas 45 exibem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico dos carbapenemas. As OXA do tipo carbapenemases são comumente encontrados em *A. baumannii*. Esses micro-organismos possuem enzimas específicas com baixa eficiência catalítica, porém em conjunto com a deleção de porinas e outros mecanismos de resistência a antimicrobianos, podem causar elevada resistência aos carbapenemas (NAAS et al., 2006). Dentre os subgrupos filogenéticos já identificados, seis foram descritos em *A. baumannii*, entre eles estão: OXA-23-like (OXA-23, OXA-27 e OXA-49), OXA-24/40-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72 e OXA-160), OXA-51-like, OXA-58-like (OXA-96 e OXA-97), OXA-143-like e OXA-235-like (HIGGINS et al., 2009, MEDEIROS; LINCOPAN et al., 2011, POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010, HIGGINS et al., 2013). Todos esses subgrupos estão relacionados à resistência adquirida aos carbapenemas, exceto o subgrupo OXA-51-like que é composto por enzimas intrínsecas desse micro-organismo (HERITIER et al., 2005). Para que os genes *bla*_{OXA} sejam expressos, muitas vezes é necessária a presença de SI. Dentre as já descritas em *Acinetobacter*, as mais comumente conhecidas são as IS*Aba*1, IS*Aba*2, IS*Aba*3 e IS*Aba*4. Os genes *bla*_{OXA-23-like},

*bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-58-like} frequentemente possuem associação com essas SI (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Além das β -lactamases, a perda de porinas que são proteínas capazes de formar canais que permitem a passagem de muitas substâncias hidrófilas, incluindo antimicrobianos, também pode ser incluída como um mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. A perda de uma Omp de 29 kDa em *A. baumannii*, permite que cepas desse micro-organismo se tornem resistentes ao imipenem e ao meropenem (NAAS et al., 2006).

1.5.2 Aminoglicosídeos

A atividade dos aminoglicosídeos depende da ligação a um local conservado do 16S rRNA da subunidade 30S do ribossoma bacteriano, o que resulta numa produção de proteínas deficientes que ao se integrarem na membrana citoplasmática da bactéria, são capazes de alterar a sua permeabilidade (SOUSA, 2006). Dentre os mecanismos de resistência dos aminoglicosídeos podemos citar a diminuição da permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo e substituições de aminoácidos em proteínas ribossomais, porém o mecanismo de resistência mais comum é o enzimático, que leva a modificações do antimicrobiano (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

A metilação do 16S rRNA, que consiste numa alteração do alvo do antimicrobiano, foi descrita como um mecanismo de resistência (DOI; ARAKAWA, 2007). Essas 16S rRNA metiltransferases (RMT) conferem um elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos clinicamente utilizados como, amicacina, gentamicina e tobramicina (DOI; ARAKAWA, 2007, DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2008). Os genes correspondentes estão associados a estruturas de transposons, que podem estar localizados em plasmídeos transferíveis, facilitando sua propagação horizontal.

Cepas que produzem RMT são também resistentes principalmente aos β -lactâmicos de amplo espectro através da produção de ES β L ou M β L, isso dificulta ainda mais o tratamento das infecções causadas por bactérias que codificam esse mecanismo de resistência (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). As RMT são divididas em famílias (ArmA, RmtA, B, C e D), entretanto apenas as famílias ArmA (DOI et al., 2007, ZHOU et al., 2010, CHO et al., 2009, KARAH et al., 2011, BRIGANTE et al., 2012, STRATEVA et al., 2012, AGHAZADEH et al., 2013, HONG et al., 2013, TADA et al., 2013, YAMADA; SUWABE, 2013, BAKOUR et al., 2014) e RmtB (TADA et al., 2013) já foram descritas em *A. baumannii*.

ArmA é a mais frequentemente encontrada e sugere-se que o gene *armA* tenha sido adquirido horizontalmente de um doador desconhecido (DOI et al., 2007).

Já as EMA catalisam a modificação dos grupos hidroxila (OH) ou amino (NH₂) dos aminoglicosídeos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; WACHINO; ARAKAWA, 2012) e são classificadas em três tipos: nucleotidiltransferases (ANT), fosfotransferases (APH) e acetiltransferases (AAC) (BECKER; COOPER, 2013, GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY et al., 2016). As ANT transferem um grupo adenilato do Adenosina Trifosfato (ATP) ao grupo OH do aminoglicosídeo. São divididas em cinco classes, porém em *A. baumannii* foram relatadas três [ANT(2''), ANT(3'') e ANT(3'')] (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010, KARAH, 2011).

Outra subclasse destas enzimas é APH, codificadas pelo gene *aph(3')-VI*, descrito pela primeira vez em *A. baumannii* e é a AME mais frequente nesta espécie (BECKER; COOPER, 2013). As APH transferem ATP ou Guanosina Trifosfato (GTP), na presença de Mg²⁺, para um grupo OH do aminoglicosídeo (WRIGHT; THOMPSON, 1999). A classe mais numerosa é a das APH(3'), sendo subclasse mais prevalente em Gram-negativos a APH(3')-I (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

As AAC modificam os aminoglicosídeos transferindo um grupo acetil da acetil-coenzima A para um grupo NH₂ deste antimicrobiano (CALDWELL; BERGHUIS, 2012). As AAC(6')-I pertencente a classe AAC(6') são as mais comumente encontradas e conferem resistência à amicacina, tobramicina, netilmicina, canamicina, entre outros (NIGRO; POST; HALL, 2011). Em *A. baumannii* já foram descritas as enzimas AAC(3)-Ia, AAC(3)-IIa, AAC(6')-Ib, AAC(6')-Ih, AAC(6')-Iad, AAC(6')-Im e AAC(6')-II (KARAH, 2011).

Os genes de EMA estão localizados em elementos genéticos móveis como em plasmídeos, transposons e integrons, por isso possuem alta capacidade de disseminação (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Estes genes auxiliam no aumento de resistência das cepas de *A. baumannii* já que encontram-se junto a outros determinantes de resistência como ESBLs (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

1.5.3 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas atuam inibindo a DNA girase das bactérias Gram-negativas, evitando assim que haja uma replicação do material genético (BONOMO; SZABO, 2006; CLOECKAERT, 2013). A aquisição de resistência às fluoroquinolonas em Gram-negativos pode estar relacionada com mutações em genes que codificam as topoisomerasas ou mutações

no sistema de regulação de bomba efluxo. Em *A. baumannii*, uma única mutação no gene *gyrA*, que codifica a DNA-girase é suficiente para conferir altos níveis de resistência a esses antimicrobianos. Isso acontece porque esse micro-organismo possui uma baixa suscetibilidade às fluoroquinolonas, devido à baixa permeabilidade ou expressão constitutiva de bombas de efluxo (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

A super-expressão de bombas de efluxo é uma fonte de resistência adquirida às fluoroquinolonas nesta espécie. Já se sabe que a super-expressão do *operon* *adeABC*, assim como do *operon* *AdeIJK* (exclusivo de *A. baumannii*), que pertencem ao sistema de bomba de efluxo resistência-nodulação-divisão (RND, Resistance-Nodulation-Division), está envolvida não só na resistência às fluoroquinolonas, mas também na resistência de *A. baumannii* aos aminoglicosídeos (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001, DAMIER-PIOLLE et al., 2008). Além disso, a super-expressão do sistema do *operon* *AbeM*, que pertence ao sistema de bomba de efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas (MATE, *Multi-antimicrobial extrusion protein*) também contribui para a resistência adquirida às fluoroquinolonas (SU et al., 2005)

1.5.4 Inibidores da via do folato

As sulfonamidas têm efeito bacteriostático e interferem na síntese de DNA bacteriano, dentre os antimicrobianos pertencentes a essa classe, podemos citar, o sulfametoxazol que é comumente empregado em associação com o trimetoprim, uma diamino-pirimidina (GOLDBERG; BISHARA, 2012).

O efeito dos dois antimicrobianos é semelhante, pois ambos atuam na inibição da síntese dos ácidos nucléicos. As sulfonaminas por sua estrutura semelhante com o ácido p-aminobenzoico (PABA), impedem a síntese de ácido fólico bacteriano pela inibição competitiva da di-hidropteroato sintase (GOLDBERG; BISHARA, 2012). Já o trimetoprim é um análogo estrutural do ácido diidrófólico e atua inibindo a enzima di-hidrofolato redutase, responsável pela transformação do ácido fólico em sua forma metabolicamente ativa (ácido tetra-hidrofólico) (MASTERS et al., 2003)

A resistência ao sulfametoxazol nas bactérias Gram-negativas é mediada principalmente pelos genes *sul1* e *sul2* que codificam variantes da di-hidropteroato sintetase (HUOVINEN et al., 2001). Já a resistência de *A. baumannii* ao trimetoprim é mediada por mecanismos comuns a muitas bactérias, como principalmente plasmídeos contendo genes

alterados de di-hidrofolato redutase (integrans *dfr/dhfr*) (HUOVINEN et al., 2001, MAK et al., 2009; LIN et al., 2014; TAITT et al., 2014).

É importante ressaltar que embora a resistência aos inibidores da via do folato seja mediada principalmente por mecanismos específicos para essa classe de antimicrobianos, esses mecanismos são transferidos horizontalmente com genes que conferem resistência a outros antimicrobianos pois estão contidos em ilhas de resistência no genoma desses patógenos (KOCHAR et al., 2012).

1.5.5 Tetraciclinas

As tetraciclinas atuam se ligando aos ribossomos bacterianos, especificamente ao 16SrRNA altamente conservado na subunidade ribossômica 30S, interrompendo a tradução por interferir na ancoragem do RNA transportador (PIOLETTI et al., 2001). Os mecanismos de resistência à tetraciclina mais comuns são a presença de genes codificadores de bomba de efluxo e proteção ribossômica. Outros mecanismos de resistência menos comuns incluem, modificação de moléculas químicas e modificações no sítio de ação do antimicrobiano (FALAGAS et al., 2015).

Dois genes codificadores de bomba de efluxo foram relatados em *A. baumannii*, *tetA* e *tetB*. O gene *tetA* é responsável apenas pelo efluxo da tetraciclina, já *tetB* controla o efluxo da tetraciclina e minociclina (PEREZ et al., 2007, FALAGAS et al., 2015). Esses genes codificam proteínas que pertencem ao sistema de bomba de efluxo Superfamília Facilitadora Principal (MSF, *Major Facilitator Superfamily*). Diferente do primeiro mecanismo, a resistência através da proteína de proteção ribossômica protege o ribossomo do efeito das tetraciclinas e é codificada pelo gene *tetM*. Esse mecanismo ajuda a proteger os ribossomos da tetraciclina, doxíciclina e minociclina (PEREZ et al., 2007, FALAGAS et al., 2015). Moléculas de tetraciclina de última geração, como a tigeciclina, foram projetadas para superar os sistemas de bomba de efluxo ou os mecanismos de proteção ribossômica (CHOPRA, 2002).

Os genes envolvidos na inativação enzimática das tetraciclinas codificam proteínas que modificam a primeira e segunda geração de tetraciclinas, e também reconhecem a tigeciclina como substrato (AMINOV et al., 2013). Dentre esses genes, apenas o *tetX* já foi descrito em espécies de *Acinetobacter* (AMINOV et al., 2013, DENG et al., 2014).

Por fim, em *A. baumannii* vários sistemas de bomba de efluxo pertencentes ao sistema de bomba de efluxo RND (AdeABC, AdeIJK, AdeFGH, AbeM e AdeDE) foram relatados por

serem capazes de realizar a expulsão de vários agentes antimicrobianos, incluindo tetraciclina mais antigas e tigeciclina, quando mutações causam superexpressão desses sistemas (STEIN et al., 2013, DENG et al., 2014).

1.5.6 Lipopeptídeos

As polimixinas possuem ação bactericida contra bactérias Gram-negativas, interagindo com a porção lipídica A do LPS causando assim a desorganização da membrana externa. No entanto, o uso desse antimicrobiano foi descontinuado por conta de relatos de nefro e neurotoxicidade (CAI et al., 2012, HENRY et al., 2015). Porém, durante a última década, houve um aumento no interesse clínico nos lipopeptídeos (polimixinas E e B) devido ao surgimento de cepas Gram-negativas resistentes às cefalosporinas, aos aminoglicosídeos e aos carbapenemas. Na maioria das vezes as polimixinas são eficazes contra cepas MDR (LI et al., 2006), estudos mostraram uma taxa de cura de 57-77% ou melhora entre pacientes com infecções graves causadas por *A. baumannii* MDR (VOURLI et al., 2015).

Apesar de serem utilizados como alternativa de tratamento de infecções causadas por cepas MDR ou XDR, têm aumentado os relatos de cepas resistentes a esse antimicrobiano, e isso é preocupante, uma vez que as polimixinas são a única opção terapêutica em muitos casos (DA SILVA; DOMINGUES, 2017).

Em *A. baumannii*, a aquisição de resistência está principalmente relacionada com alterações na via de biossíntese do LPS. Até o momento, foram descritos dois mecanismos de resistência adquirida: a modificação do lipídeo A pela adição de fosfoetanolamina (PEtN), como consequência de mutações no sistema de dois componentes PmrAB, e a perda completa do LPS devido à síntese prejudicada do lipídeo A. No entanto, outros genes que afetam a biossíntese de LPS e a estrutura do lipídeo A também já foram descritos. Além disso, bombas de efluxo também podem estar envolvidas na resistência à colistina (DA SILVA; DOMINGUES, 2017).

Mutações no sistema de dois componentes PmrAB podem resultar na resistência às polimixinas por alterações do lipídeo A (componente do LPS). A modificação do LPS diminui a afinidade das polimixinas ao lipídeo A, sendo esse o mecanismo mais comum de resistência a esses antimicrobianos. Em *A. baumannii*, as mutações nos genes *pmrA* e/ou *pmrB* (mais comum em *pmrB*) podem induzir a expressão constitutiva de *pmrA* que leva à um aumento na

regulação do *operon pmrCAB* e conseqüentemente a síntese e adição de PEtN ao lípideo A (ADAMS et al., 2009, ARROYO et al., 2011, BECEIRO et al., 2011).

A perda completa da produção de LPS ocorre por conta de mutações ou inativação por inserção da sequência de inserção *ISAbal1* nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD*, que codificam as enzimas que catalisam as primeiras etapas da biossíntese do LPS (MOFFATT et al., 2010, MOFFATT et al., 2011); e mutações no gene *lpsB* que codifica uma glicosiltransferase envolvida na biossíntese do LPS, esse último mecanismo também tem sido implicado na resistência à polimixina (HOOD et al., 2013, LEAN et al., 2014). Esses genes não são geralmente transmitidos entre as bactérias, e por conta disso, dificilmente poderá ocorrer uma ampla disseminação (HOOD et al., 2013).

Mutações em genes diferentes de *pmrA*, *pmrB* e *lpxACD* também podem ser responsáveis pela alteração da suscetibilidade antimicrobiana à polimixina. A distribuição assimétrica de lipídeos na membrana externa de bactérias Gram-negativas é essencial para sua função como barreira e integridade da célula. O acúmulo de fosfolipídeos na membrana externa modifica a organização do LPS e aumenta a passagem de pequenas moléculas tóxicas através da membrana.

Recentemente, foi descrito que mutações nos genes *vacJ* e *pldA*, podem ter um papel na resistência de *A. baumannii* à polimixina E devido à relação desses genes com manutenção da distribuição assimétrica de lipídeos na membrana externa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A lipoproteína da membrana externa VacJ é parte do sistema transportador Vps-VacJ ABC, sendo também responsável pela manutenção dos fosfolipídeos e do LPS na membrana externa (MALINVERNI; SILHAVY, 2009). Além disso, também já foi descrito que a atividade da PldA, uma fosfolipase, é maior em células bacterianas com membranas desestabilizadas e por isso, pode estar envolvida na remoção de fosfolipídeos na membrana externa para manutenção da assimetria (AUDET; NANTEL; PROULX, 1974).

Alguns estudos sugerem que bombas de efluxo podem estar envolvidas no fenótipo de resistência à polimixina em *A. baumannii*. Genes que codificam bombas de efluxo podem ser regulados positivamente em resposta à concentração fisiológica de NaCl, resultando em uma tolerância a diversos antimicrobianos, incluindo a polimixina E (HOOD et al., 2010). Mais recentemente, outro estudo mostrou que o uso de inibidores de bomba de efluxo pode reduzir significativamente as concentrações inibitórias mínimas de polimixina E, sugerindo o envolvimento de bombas de efluxo na resistência a esse antimicrobiano (NI et al., 2016).

Em 2016, foi descrito pela primeira vez, um plasmídeo mediando resistência à polimixina E (LIU et al., 2016). Nesse caso, o gene presente nele, diferente dos descritos

anteriormente, pode ser transmitido horizontalmente e disseminar essa resistência (LIM et al., 2015, PATERSON; HARRIS, 2016). A *Mcr-1* é uma fosfoetanolamina (PEA) transferase que adiciona PEA ao lipídeo A presente no LPS da membrana externa das bactérias, isso diminui sua carga negativa e, conseqüentemente, reduz a afinidade das polimixinas (SUN et al., 2018).

O *mcr-1*, até o momento, foi descrito em algumas bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LEANGAPICHART et al., 2016, LIU et al., 2016). Em *A. baumannii*, o primeiro relato da presença desse gene mediado por plasmídeo ocorreu no Paquistão, em 2019 (MUHAMMAD et al., 2019).

A resistência à polimixina E (colistina) em cepas clínicas *A. baumannii* é raramente relatada, entretanto a avaliação da suscetibilidade à polimixina é controversa, já que muitos laboratórios não usam a técnica indicada nessa avaliação, que é a microdiluição (HINDLER; HUMPHRIES, 2013). O primeiro relato de *A. baumannii* resistente à polimixina ocorreu na Coréia do Sul em 2005 (LI et al., 2006), mais tarde foram relatados em outros hospitais coreanos em 2007 (KO et al., 2007). Um surto de cepas de *A. baumannii* PDR (incluindo polimixina E) foi relatado na Espanha em 2009 (VALENCIA et al., 2009) e mais recentemente, foram recuperados *A. baumannii* resistentes à polimixina no Irã (BAHADOR et al., 2013, VOURLI et al., 2015), Estados Unidos da América (LESHO et al., 2013) e Brasil (TOGNIM et al., 2006, GENTELUCI et al., 2016, GOMES et al., 2016). Em geral, os estudos mostram que Ásia e a Europa apresentam uma situação mais grave de resistência à polimixina, com mais relatos e taxas mais altas de resistência, enquanto taxas mais baixas e menos relatos de resistência são apresentados nas Américas do Norte e do Sul (CAI et al., 2012).

1.6 Heterorresistência e resistência adaptativa às polimixinas

As taxas de resistência às polimixinas em estudos de vigilância com cepas de *A. baumannii*, em geral, são baixas (GALES; JONES; SADER, 2011), porém dois fenótipos de resistência a esses antimicrobianos têm sido relatados, a heterorresistência e a resistência adaptativa (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010, CAI et al., 2012).

O termo heterorresistência é definido como a presença de resistência a certos antimicrobianos, expressa por um subconjunto de uma população microbiana que é geralmente considerada suscetível a estes antimicrobianos de acordo com os testes de suscetibilidade *in vitro*. Vários fatores podem posteriormente levar à proliferação da subpopulação resistente e ao surgimento de uma cepa totalmente resistente (FALAGAS et al., 2008).

A heterorresistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida e os mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento se assemelham aos envolvidos na resistência antimicrobiana geral e dependem de mecanismos genéticos e fenotípicos (HALFAWY; VALVANO, 2015). Os mecanismos genéticos incluem a presença de mutações ou a duplicação gênica de genes-alvo de drogas e sistemas reguladores, enquanto os mecanismos fenotípicos envolvem a modulação da resposta bacteriana à presença de compostos nocivos no ambiente (DE JONGE et al., 1996, YAU et al. 2012, HALFAWY; VALVANO, 2013).

A utilização única de polimixina no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, pode ser a principal causa do aumento de subpopulações resistentes, especialmente em alta densidade bacteriana. Isso sugere que seja necessária uma concentração suficientemente alta do antimicrobiano no início da terapia para erradicar estas subpopulações resistentes. No entanto, a utilização única de polimixina B é complicada por conta principalmente de sua toxicidade (ZAVASCKI et al., 2007, FAN et al., 2016). Por essa razão, muitos profissionais médicos preferem prescrever o uso terapêutico das polimixinas em associação a outros antimicrobianos para tratar infecções por *A. baumannii* XDR, especialmente por serem observados efeitos sinérgicos comprovados no uso dessas associações em estudos *in vitro* (NI et al., 2015, FAN et al., 2016).

A heterorresistência à polimixina tem sido relatada entre cepas de *A. baumannii* e está associada com falha terapêutica (POURNARAS et al., 2007, YAU et al., 2009, MELETIS et al., 2011). A detecção de cepas clínicas heterorresistentes fornece um aviso de que se as polimixinas forem utilizadas de forma inadequada, pode haver um rápido desenvolvimento de resistência (LI et al., 2005). Além disso, o uso prévio de polimixina pode ser um fator de risco para o aumento da taxa de heterorresistência (CAI et al., 2012). Um estudo com cepas coletadas no sul do Brasil investigou a presença de heterorresistência, mas esse fenômeno não foi encontrado em nenhuma cepa, no entanto, a presença de subpopulações com Concentração Inibitória Mínima (CIM) aumentada, foi detectada em 90% das cepas testadas (BARIN et al., 2013).

A taxa de heterorresistência às polimixinas em *A. baumannii* é geralmente mais alta do que a taxa de resistência, porém é muito variável (HAWLEY; MURRAY; JORGENSEN, 2008). Estudos mostraram variações de 0,9% a 100% das taxas de heterorresistência (GALES; REIS; JONES, 2001, YAU et al., 2009, GALES; JONES; SADER, 2011). Isso pode ocorrer devido à falta de um experimento padronizado para determinar a heterorresistência (HAWLEY; MURRAY; JORGENSEN, 2008).

A resistência adaptativa é um fenômeno autorregulado caracterizado por uma rápida indução de resistência na presença do antimicrobiano e uma reversão para o fenótipo suscetível na sua ausência (SKIADA et al., 2007). Estudos demonstraram a presença de resistência adaptativa às polimixinas, principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* (SKIADA et al., 2007). Em *A. baumannii*, existe apenas um estudo sobre resistência adaptativa, nele foi revelada a presença desse fenótipo na maioria das cepas, sendo que todos demonstraram resistência à polimixina B em altas concentrações (BARIN et al., 2013).

1.7 Formação de biofilme

Biofilmes são comunidades complexas onde micro-organismos vivem sobre superfícies abióticas (plástico, vidro, metal e sais minerais) ou bióticas (plantas, animais e seres humanos) embebidos em uma matriz de substâncias extracelulares criadas por eles próprios. Dentre os componentes dessa matriz podemos citar polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular (SHARMA et al., 2014). Nesse ambiente, os micro-organismos podem interagir uns com os outros e com o meio onde se encontram, além disso, as bactérias dentro do biofilme têm maior tolerância às tensões extracelulares (GREENE et al., 2016a, GREENE et al., 2016b).

Há três etapas fundamentais para a formação de biofilme. A primeira etapa é a adesão das células bacterianas planctônicas (colonizadores primários) às superfícies. Esta adesão inicial pode ser mediada por contato eletrostático ou interação de estruturas bacterianas (como por exemplo, proteínas e carboidratos) com as superfícies inertes ou revestidas com proteínas e carboidratos. A segunda etapa é o crescimento dos colonizadores primários e maturação do biofilme, que acontece à medida que os micro-organismos começam a gerar exopolissacarídeos (EPS) que estabilizam a matriz do biofilme. Além disso, as bactérias começam a se multiplicar sem soltar células descendentes, ou os colonizadores primários recrutam e agregam membros planctônicos das mesmas espécies ou de outras espécies. Enfim, a terceira etapa é o descolamento, onde membros previamente sésseis do biofilme maduro se separam e atuam como colonizadores primários em diferentes locais. Esse descolamento pode ser dividido em dois tipos: ativo e passivo. O descolamento ativo é iniciado pelas próprias bactérias por *quorum sensing* (QS), por exemplo, e ocorre a degradação enzimática da matriz do biofilme. Já o descolamento passivo é causado por forças externas, tais como raspagem e intervenção humana (LAVERTY, GORMAN; GILMORE, 2014).

Existem muitos estudos que avaliam a associação dos surtos hospitalares e das infecções graves com a resistência aos antimicrobianos de *A. baumannii*, porém outros fatores que determinam a virulência e a patogenicidade deste micro-organismo ainda precisam ser melhor elucidados. Dentre esses fatores, a capacidade de formar biofilme é considerada um dos principais e muito comum entre um grande número de cepas de *A. baumannii* (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2008, KING et al., 2009, EIJKELKAMP et al., 2011, GURUNG et al., 2013). Além disso, a formação de biofilme também pode ser um mecanismo de resistência aos antimicrobianos e favorecer ainda mais a persistência e a disseminação desse micro-organismo no ambiente hospitalar (VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003, LEE et al., 2006, NEELY, 2010).

A capacidade de *A. baumannii* formar biofilme em superfícies abióticas é um importante fator a se considerar em infecções hospitalares, devido à colonização da superfície de equipamentos hospitalares e dispositivos médicos, tais como cateteres urinários, cateteres venosos centrais e tubos endotraqueais (TRAUTNER; DAROUICHE, 2004, GREENE et al., 2016a). Sabe-se que a interação de *A. baumannii* com diferentes superfícies pode variar de acordo com as características específicas de cada cepa (McQUEARY; ACTIS, 2011).

O uso de cateteres urinários pode provocar uma infecção urinária associada ao cateter em pacientes imunocomprometidos. O biofilme nesses locais pode ser favorecido pelo tempo de contato do cateter com o paciente e pode ser composto por uma ou mais espécies bacterianas (biofilme multi-espécies) incorporadas principalmente numa matriz rica em EPS (WONG et al., 2017). Já o uso de cateteres venosos centrais pode provocar infecção da corrente sanguínea associada ao cateter. Essas infecções são normalmente causadas por bactérias Gram-positivas, porém infecções por bactérias Gram-negativas vêm se tornando cada vez mais frequentes (FARRINGTON; ALLON, 2019). As infecções na corrente sanguínea causadas por *A. baumannii* são mais difíceis de tratar, devido entre outros fatores, a sua resistência aumentada (HANNA, 2004, DJERIBI et al., 2012). Também já foi demonstrada a presença frequente desse micro-organismo no biofilme de superfície interna de tubos endotraqueais (GIL-PEROTIN et al., 2012).

A. baumannii também é capaz de formar biofilmes em superfícies bióticas tais como, superfícies de células epiteliais (GADDY; ACTIS, 2009). Essa adesão é o passo inicial para a colonização e infecção do hospedeiro. Assim como ocorre na adesão às superfícies abióticas, essa capacidade de aderir varia entre os diferentes cepas de *A. baumannii* (LEE et al., 2006).

1.7.1 Fatores envolvidos na formação de biofilme de *A. baumannii*

A formação de biofilme tem um caráter multifatorial, vários determinantes de virulência têm sido relatados por desempenharem um papel no desenvolvimento de biofilme e aderência de *A. baumannii* em superfícies bióticas e abióticas. Dentre eles podemos citar o sistema de montagem Usher-chaperona CsuA/BABCDE, que é regulado por um sistema de dois componentes (BfmS/BfmR) (TOMARAS et al., 2003, TOMARAS et al., 2008, de BREIJ et al., 2009); OmpA de 38 kDa (CHOI et al., 2005); OmpA de 854 kDa, com uma grande semelhança com a proteína associada ao biofilme (Bap) de estafilococos (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008); o auto-indutor sintase AbaI, parte do sistema de QS (NIU et al., 2008); e o *operon* pgaABCD, responsável pela produção de poli- β -1,6-N-acetilglicosamina (PNAG) (CHOI et al., 2009).

No entanto, nem todos esses fatores participam da formação de biofilme em superfícies abióticas e na aderência às células hospedeiras. Esta diferença pode ser observada na aderência às superfícies abióticas ou bióticas mediada por diferentes *pili*. Estudos mostraram que a produção de *pili* mediada pelo sistema de montagem de Usher-chaperona CsuA/BABCDE é necessária para a ligação e formação de biofilmes em superfícies abióticas pela cepa *A. baumannii* ATCC 19606 (TOMARAS et al., 2003). Este *operon* parece estar difundido entre as cepas clínicas, isso indica que o *pilus* codificado por este sistema pode ser um fator comum entre as diferentes cepas. No entanto, algumas cepas clínicas não possuem esse sistema de montagem (de BREIJ et al., 2009, WRIGHT et al., 2016), o que indica que esses *pili* podem não ser necessários para a formação e manutenção de biofilme em todas as cepas ou que outros sistemas *pili* possam substituí-los funcionalmente (de BREIJ et al., 2009).

Além disso, um segundo sistema de dois componentes denominado GacSA46 também demonstrou controlar moderadamente a expressão do gene *csu* e, indiretamente, a formação de biofilme. Esse mesmo estudo desmostrou que concentrações subinibitórias de trimetoprim-sulfametoxazol reprimem completamente a expressão de Csu *pili* em *A. baumannii*, o que indica que o uso indevido de antimicrobianos pode alterar comportamentos em nível populacional e pode impedir a formação de biofilme (MOON; WEBER; FELDMAN, 2017). Outros sistemas de montagem de Usher-chaperona para produção de *pili* e sistemas de Pap *pili*, que são homólogos ao P *pili* de *E. coli*, também têm sido implicados na formação e manutenção do biofilme de *A. baumannii*, mas ainda são necessárias análises moleculares para descrever seu papel específico (EIJKELKAMP et al., 2014).

A adesina bacteriana Bap, que é conservada entre as diferentes cepas de *A. baumannii*, é expressa na superfície da célula e também está envolvida na maturação do biofilme em diferentes substratos (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008, GOH et al., 2013). A Bap de *A. baumannii* é secretada por um sistema de secreção do tipo I que medeia a formação e a maturação do biofilme desse micro-organismo (HARDING et al., 2017). Essa proteína parece ser necessária para a formação da estrutura tridimensional do biofilme e a formação de canais da água, principalmente no biofilme formado sobre superfícies médicas relevantes, incluindo o polipropileno, o poliestireno e o titânio (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008). Além disso, Bap é capaz de aumentar a adesão de *A. baumannii* às células epiteliais brônquicas humanas normais e queratinócitos de neonatos normais, provavelmente através do aumento da hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012, DE GREGORIO et al., 2015). Algumas cepas de *A. baumannii* também codificam as proteínas semelhantes à Bap, Blp1 e Blp2, que contribuem de forma coordenada para a formação de biofilme maduro de forma semelhante a de BapAb (DE GREGORIO et al., 2015)

Em *A. baumannii*, um sistema de O-glicosilação de proteínas também foi recentemente relacionado com a capacidade de formação de biofilme, sugere-se que a glicosilação promove a fixação inicial, aumenta a massa e densidade do biofilme maduro, promovendo uma função na adesão célula-célula. A maquinaria de O-glicosilação parece estar presente em todos os genomas sequenciados, sugerindo a existência de uma forte pressão evolutiva para manter este sistema (IWASHKIW et al., 2012). Outro componente importante para a organização e estrutura do biofilme é o O-pentassacarídeo encontrado nas glicoproteínas. Esse polissacarídeo é sintetizado pelo *locus pglC* e influencia diretamente na ligação das células bacterianas às superfícies abióticas (LEES-MILLER et al., 2013).

Outro fator envolvido na formação de biofilme é a proteína fotorreceptora BlsA que pode afetar biofilme de *A. baumannii* em superfícies de vidro em resposta à luz. Além disso, essa proteína também parece estar envolvida na motilidade e virulência desse micro-organismo (MUSSI et al., 2010).

O desenvolvimento e maturação de biofilmes de cepas de *A. baumannii* também dependem da capacidade para produzir e secretar PNAG, principal componente da matriz exopolissacarídica do biofilme desse micro-organismo. PNAG é codificado por um conjunto de quatro genes (*operon pgaABCD*) e é produzida por quase todas as cepas de *A. baumannii* (CHOI et al., 2009).

Por outro lado, algumas proteínas parecem desempenhar um papel chave na formação de biofilme, tanto em superfícies bióticas quanto em abióticas, promovendo a ligação da célula

à superfície e adesão célula-a-célula. A OmpA, uma porina de 38 kDa que é capaz de gerar um poro de difusão de 1,3 nm, possui função na adesão de *A. baumannii* em plásticos, e também na interação do patógeno com as células epiteliais humanas e filamentos de *Candida albicans* (CHOI et al., 2005, CHOI et al., 2008, GADDY; ACTIS, 2009).

Por fim, cepas de *Acinetobacter* também são capazes de produzir moléculas sinalizadoras (QS) que permitem que as bactérias controlem sua aderência e formação de biofilmes em resposta a densidade populacional (GONZÁLEZ; NUSBLAT; NUDEL, 2001, BHARGAVA; SHARMA; CAPALASH, 2010). Uma importante molécula sinalizadora produzida por *A. baumannii* é N-acil-homoserina lactona (ou seja, lactona de N-3-hydroxydodecanoyl-homoserina), que está envolvida na formação de biofilmes em superfícies abióticas (NIU et al., 2008, RUMBO-FEAL et al., 2013).

Assim como em outros micro-organismos (STANLEY; LAZAZZERA, 2004), a formação de biofilme por *A. baumannii* está sob o controle de vários fatores como a presença de genes de resistência aos antimicrobianos, condições de crescimento e a densidade celular (GADDY; ACTIS, 2009). Condições ambientais, como a temperatura de crescimento e concentração de ferro livre extracelular, que são conhecidos por sua importância na interação de *A. baumannii* com o hospedeiro, também afetam a quantidade de biofilme formado em superfícies abióticas (plástico) (LEE et al., 2006, LEE et al., 2008).

1.7.2 Efeito do etanol na formação de biofilme de *A. baumannii*

Devido à persistência e à transmissão de *A. baumannii* em ambiente hospitalar, além da morbidade e mortalidade das infecções provocadas por esse micro-organismo, práticas de higiene rigorosas têm sido implementadas na maioria das instituições médicas, dentre elas o uso de géis e espumas à base de etanol. Esses agentes quando utilizados corretamente são eficazes em reduzir as cargas bacterianas entre os profissionais de saúde e pacientes, assim como a transmissão nosocomial de patógenos e a taxa de incidência de infecções hospitalares. No entanto, a não conformidade com os protocolos estabelecidos e a redução das concentrações eficazes de álcool, devido a sua volatilidade, podem proporcionar uma oportunidade para *A. baumannii* persistir nesse ambiente (KAMPF; KRAMER, 2004).

Trabalhos demonstraram a capacidade de *A. baumannii* metabolizar baixas concentrações de álcool etílico e ainda, aumentar sua taxa de crescimento e patogenicidade (EDWARDS; PATEL; WAREHAM, 2007). Estudos também demonstraram que a presença de etanol induz uma resposta diferencial na expressão de genes e a produção de proteínas

relacionadas com funções metabólicas centrais associadas com assimilação do etanol, além de induzir respostas relacionadas com o metabolismo geral, como produção de energia, nucleotídeos e biossíntese de proteínas (NWUGO et al., 2012). Um estudo identificou 49 genes induzidos pelo etanol capazes de desempenhar funções de regulação global. Esses genes codificam para funções metabólicas, respostas ao estresse e funções de virulência, afetando a patogenicidade de *A. baumannii* (CAMARENA et al., 2010).

A presença de concentrações baixas de etanol, principalmente em meios com restrição de nutrientes pode induzir a produção de OmpA, proteína que desempenha um papel relevante na virulência e na interação com células humanas (EDWARDS; PATEL; WAREHAM, 2007, GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009, CHOI et al., 2009). Foi observado também, que a exposição de *A. baumannii* ao etanol, além de aumentar seu crescimento, controla a resposta desses micro-organismos a presença de sal e aumenta sua patogenicidade (SMITH; DES ETAGES; SNYDER, 2004).

Além disso, o etanol nas concentrações 1% e 2% pode afetar positivamente a formação de biofilmes em superfícies abióticas, já que a produção de proteínas envolvidas no anabolismo de lipídeos e carboidratos aumenta na presença de etanol. O aumento de carboidratos junto a diminuição da motilidade bacteriana pode favorecer a formação de biofilme em superfícies abióticas (NWUGO et al., 2012). O biofilme em si é capaz de diminuir a penetração de etanol e proteger as células desse antisséptico, não só por causa do seu encaixe no interior da matriz do biofilme e estruturas multicelulares, mas também porque células em biofilmes são mais resistentes a danos celulares induzidos por etanol (VERSTRAETEN et al., 2008).

A presença de etanol (1% e 2%) também induz uma resposta acetogênica que resulta numa redução significativa do pH no sobrenadante da cultura, por conta da produção de derivados de ácidos, tais como ácido indole-3-acético (IAA) (NWUGO et al., 2012). Esse derivado tem um efeito sobre a expressão de genes e fisiologia bacteriana, além de aumentar a produção de lipopolissacarídeos, substâncias exopoliméricas que favorecem a formação de biofilme e induzem resistência ao estresse (BIANCO et al., 2006, YANG et al., 2007, HOSHI et al., 2009). Essa indução de resposta à adaptação ao estresse pode incluir a expressão diferencial de genes e produção de proteínas relacionadas com o estresse oxidativo, tais como a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e alquilo redutase hidroperóxido, em adição às proteases e chaperonas, que protegem as células de perturbações causadas por enrolamento incorreto das proteínas (FIESTER; ACTIS, 2013).

Por fim, o etanol é capaz de induzir a expressão de fatores que afetam as interações patógeno-hospedeiro, como aderência e formação de biofilme; e ainda favorece o crescimento de bactérias, fornecendo uma fonte de carbono imprevisível (FIESTER; ACTIS, 2013). Isso se torna preocupante já que em muitos hospitais, antissépticos à base de álcool, que consistem em várias concentrações de álcool etílico ou isopropílico, muitas vezes em combinação com outras substâncias como clorexidina e emolientes orgânicos, têm encontrado ampla aceitação como uma alternativa para a lavagem das mãos (KAMPF; KRAMER, 2004).

1.8 Relevância e justificativa

A. baumannii é um patógeno comumente responsável por causar infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). As IRAS são adquiridas durante a prestação dos cuidados de saúde e constituem um grave problema de saúde pública mundial, já que aumentam a morbidade e a mortalidade entre os pacientes, e conseqüentemente a duração do tratamento da doença e a elevação dos custos envolvidos nesse cuidado (DAI et al., 2010). Esse micro-organismo causa infecções com risco de vida principalmente em indivíduos imunocomprometidos e é caracterizado por potenciais mecanismos de resistência a antimicrobianos, desafio fundamental para a prevenção e controle de IRAS (NEIDELL et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes para a saúde humana (BASSETTI; GINOCCHIO; MIKULSKA, 2011) e os agentes patogênicos MDR mais comuns e graves foram englobados dentro da sigla "ESKAPE", dentre eles, *A. baumannii* (RICE et al., 2008). Em 2017, a OMS publicou um relatório onde também destacou *A. baumannii* resistente aos carbapenemas que foi classificado no grupo de “prioridade 1 para pesquisa de novos antibióticos” e foi considerado como um patógeno “crítico” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A multirresistência desse micro-organismo, mediada por enzimas do tipo OXA contribui para sua persistência e para a propagação da resistência bacteriana nesse ambiente (POIREL; NORDMANN, 2006, PEREZ et al., 2007, FEIZABADI et al., 2008). Além disso, o aparecimento de cepas resistentes a todos os antimicrobianos, inclusive à polimixina B, está cada vez mais comum. O esclarecimento da resistência a esse antimicrobiano, por meio de prevalência de heterorresistência e indução de resistência adaptativa, é de grande importância para minimizar falhas terapêuticas.

Outro fator que pode influenciar no sucesso de *A. baumannii* como patógeno é sua capacidade de aderir a superfícies abióticas. A formação de biofilme é considerada um importante problema de saúde pública, pois esse mecanismo, além de funcionar como uma barreira à ação dos antimicrobianos, também auxilia na persistência e dificulta a eliminação desses micro-organismos do ambiente. A eliminação de *A. baumannii*, principalmente quando estão em biofilmes, é problemática. Existem evidências que baixas concentrações de antissépticos de uso frequente no ambiente hospitalar, como etanol, podem induzir a formação de biofilme e auxiliar na persistência desse patógeno nesse ambiente. Porém, não há estudos que caracterizam a natureza do biofilme de *A. baumannii* ou analisem a atuação de etanol, antisséptico comumente utilizado em hospitais, em biofilmes formados por cepas circulantes no Brasil.

Cabe ressaltar a relevância deste estudo para o sistema de saúde, já que resultados obtidos, permitirão uma análise qualitativa, comparativa e complementar a outras abordagens científicas do tema, auxiliando na implementação de estratégias que podem reduzir surtos hospitalares. Para a vigilância sanitária, poderá auxiliar na identificação, na prevenção e no controle das IRAS. Além disso, facilitará a conscientização dos profissionais de saúde em relação à necessidade de maior rigor na prescrição de antimicrobianos, contribuindo assim para o bem-estar da população.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar a resistência à antimicrobianos, capacidade de formar biofilme, bem como o efeito de substâncias antissépticas sobre essa estrutura de cepas de *Acinetobacter baumannii* coletadas de dois hospitais do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os isolados em espécies de *Acinetobacter*;
- Avaliar a diversidade clonal das cepas;
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a concentração inibitória mínima (CIM);
- Estudar a frequência de heterorresistência e a resistência adaptativa à polimixina B em cepas de *A. baumannii*;
- Pesquisar a presença dos genes codificadores de OXA, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}; da associação da sequência de inserção *ISAbal1* com o gene *bla*_{OXA-23}; e do gene de resistência à polimixina B, *mcr-1*;
- Detectar a capacidade das cepas de *A. baumannii* formar biofilme sobre superfície de poliestireno;
- Testar diferentes tratamentos (metaperiodato de sódio, protease, DNase) para avaliar a natureza química do biofilme;
- Avaliar o efeito de etanol na formação de biofilme de *A. baumannii*;
- Visualizar o biofilme formado por *A. baumannii* por Microscopia de Varredura Confocal à Laser (MVCL).

3 METODOLOGIA

3.1 Isolados bacterianos

Foram estudados 72 isolados de *Acinetobacter baumannii*, coletados de pacientes hospitalizados em dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro, no período compreendido entre 2014 e 2015.

3.2 Confirmação da identificação dos isolados

Os isolados foram previamente identificados nos hospitais de origem por meio do sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO) utilizando o cartão para identificação de Gram-negativos (GN, referência 21341). A partir disso, foi realizada novamente a verificação da pureza desses isolados por meio da observação das características coloniais em meio de cultura Eosina Azul de Metileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e Agar MacConkey (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA) após incubação por 18-24 h a 37°C. Então, os isolados foram submetidos à técnica de coloração de Gram, para a avaliação de suas características morfo-tintoriais e identificados por meio de testes bioquímicos convencionais como: teste de motilidade, utilização do citrato (Simmons), produção de indol, oxidação e fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson e teste da produção da citocromo oxidase, segundo Murray et al. (2010). Na **Tabela 1**, são apresentados os resultados esperados para os testes bioquímicos convencionais relevantes para a identificação de micro-organismos do gênero *Acinetobacter*.

Tabela 1 - Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) e espécies relacionadas.

Micro-organismos	MOT	CIT	INDOL	OF-G	OXI
Complexo Acb	neg	+	neg	O	neg
<i>A. haemolyticus</i>	neg	+	neg	Inerte/O	neg
<i>A. lwoffii</i>	neg	neg	neg	Inerte	neg

Fonte: (MURRAY et al, 2010).

Legenda: MOT, teste de motilidade; CIT, utilização do citrato (Simmons); INDOL, produção de indol; OF-G, oxidação e fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson; OXI, teste da produção da citocromo oxidase.

Os isolados identificados como *Acinetobacter* foram estocados, para isso, as bactérias foram crescidas por 18-24 h em Agar Nutriente (AN, Gibco®, Invitrogen, Carlsbald, CA), inoculadas em tubos criogênicos contendo 1 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB, Gibco®, Invitrogen, Carlsbald, CA) e 20% de glicerol (v/v) e então, foram mantidas em *freezer* a -20°C e -70°C.

3.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com o protocolo Pulsenet (NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004), com algumas modificações.

Para o emblocamento das células em agarose, as cepas foram cultivadas em AN inclinado por 18-24 h a 37°C e então, foi obtida uma suspensão equivalente à escala 3,0 de McFarland em BSC (Tris 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0). Foi adicionado ao inóculo padronizado, proteinase K (50 mg/mL) e agarose *low melting* 1% (*Seaken Gold Agarose*), previamente aquecida, para o preparo dos *plugs*. Os *plugs* foram submetidos a tratamento enzimático contendo solução de lise (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 + sarcosil a 1%) e proteinase K (50 mg/mL), sendo incubados por 2 h a 50°C. Em seguida, o tampão de lise foi retirado e os blocos foram lavados 3 vezes com água Milli-Q por 15 min a 50°C e 1 vez com tampão TE (Tris, EDTA) nas mesmas condições. Por fim, os blocos foram incubados com 10 U da enzima de restrição *ApaI* (Amersham) durante 2 h a 30°C. Para separação dos fragmentos de DNA, foi realizada eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA) sob as seguintes condições: tempo de pulso crescente de 0,5 a 15 seg, por 18 h a 6 V/cm, na temperatura de 14°C, com ângulo de 120° onde um disco de cada cepa foi depositado nas canaletas do gel de agarose a 1% (p/v; Gibco) em TBE 0,4 X. Após a corrida os géis foram submetidos ao brometo de etídio (0,5 mg/mL), observados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento Image Quant 300.

A análise dos dados locais dos padrões de PFGE foi realizada visualmente; e os padrões de bandas foram interpretados de acordo com os critérios sugeridos por Tenover et al. (1995), onde as cepas que possuíam padrões de banda com diferença de seis bandas ou menos foram consideradas relacionadas epidemiologicamente (TENOVER et al., 1995). Os dendrogramas foram confeccionados a partir da foto do gel no *software* Bionumerics versão 4.0 (Applied Maths), onde as cepas com similaridade $\geq 85\%$ foram consideradas como relacionadas epidemiologicamente (SEIFERT et al., 2005).

3.4 Obtenção do ácido desoxirribonucleico genômico (DNA)

As cepas foram inoculadas em 5 mL de TSB e os tubos incubados por 18-24 h a 37°C com agitação. Após incubação, foi transferido 1 mL do crescimento bacteriano, para um microtubo com capacidade de 1,5 mL, que foi submetido à centrifugação a 24.000 g por 10 min. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *Dneasy Tissue Kit* (Qiagen, Inc, Valencia, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para certificação da extração, o material genético foi visualizado por meio de corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% em TBE 1X. Para isso, os produtos da extração (5 µL) foram aplicados nos poços acrescidos de 2 µL de tampão de carregamento (*loading buffer*). Também foi aplicado no gel um padrão de DNA contendo fragmentos de tamanhos conhecidos (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, Carlsbad, CA). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 1X, sob uma corrente de 90 V por 10 min e 120 V por 30 min. Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao tratamento com brometo de etídio (0,5 mg/mL), observados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento Image Quant 300.

3.5 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

O MLST foi utilizado para a avaliação do relacionamento genético e evolução das cepas estudadas. Para isso, as cepas de *A. baumannii* analisadas pelo PFGE, pertencentes aos pulsotipos prevalentes e ainda alguns de pulsotipos esporádicos foram empregadas nessa análise. A técnica de MLST compreende 3 etapas: 1. obtenção do DNA das amostras de interesse; 2. Amplificação e purificação; 3. sequenciamento e análise dos *loci* amplificados. Todas as etapas da metodologia do MLST foram realizadas de acordo com a base de dados do esquema Oxford e do esquema Pasteur, conforme descrito nos *sites*: https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Oxford.shtml e http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Pasteur.shtml. O sequenciamento de DNA foi realizado na plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

O DNA foi obtido como descrito no item 3.4 e empregado nas reações de PCR. Os sete genes conservados descritos pelo esquema Oxford e sete genes conservados descritos pelo esquema Pasteur foram utilizados nas reações e as seqüências dos iniciadores utilizados estão discriminadas a seguir nas **Tabelas 2 e 3**.

As PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL. As reações individuais foram compostas de 1 µL do DNA adicionados de 5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 1,5

μL de MgCl_2 (1,5 μM), 0,5 μL de cada dNTP (0,2 mM), 0,4 μL de cada *primer* (0,2 μM ; **Tabelas 2 e 3**), 0,3 μL de Taq DNA polimerase (1 U) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 45 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. As temperaturas de anelamento variaram de acordo com o *primer* utilizado (**Tabela 2 e 3**).

Os amplicons das reações foram detectados por meio de corrida eletroforética em gel de agarose a 1% em TBE 0,4X. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 0,4X, sob uma corrente de 90 V por 5 min e 120 V por 25 min. Após a corrida, os géis foram corados e visualizados como descrito no item 3.4.

3.6 Sequenciamento genético

3.6.1 Purificação do produto da PCR

A purificação dos produtos da PCR dos genes pesquisados foi realizada utilizando a coluna de purificação *Purelink PCR purification Kit* (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. O DNA purificado foi estocado a -20°C.

3.6.2 Determinação das sequências nucleotídicas

Os produtos purificados foram utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

As reações foram realizadas em microtubos e foram compostas de 2 μL de DNA purificado, 1 μL de cada *primer* (3,2 pM), e 4,5 μL de água Milli-Q estéril para um volume final de 7,5 μL . A seguir os microtubos contendo as reações foram encaminhados para a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Após o sequenciamento das cepas, os dados foram analisados pelo *software* DNASTAR, posteriormente as sequências obtidas foram submetidas ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) e comparadas a outras depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Assim, foi verificada a identidade do material sequenciado por meio do grau de similaridade com sequências depositadas no GenBank.

Tabela 2 - Sequências nucleotídicas e temperaturas de anelamento dos *primers* utilizados na amplificação dos genes utilizados na técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) de acordo com o esquema Oxford.

Genes	Fenótipo codificado	Sequência do iniciador (5'→3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento
<i>gltA</i>	Citrato sintase	F- AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C R-GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	722 pb	55°C
<i>gyrB</i>	Subunidade B da DNA girase	F- TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT R- GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G	594 pb	56°C
<i>gdhB</i>	Glicose desidrogenase B	F-GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C R-ACC ACA TGC TTT GTT ATG F-GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C R-GTT GGC GTA TGT TGT GC	774 pb	56°C
<i>recA</i>	Fator de recombinação homólogo	F-CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC R-GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	425 pb	55°C
<i>cpn60</i>	Chaperonina 60-kDa	F-GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA R-CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA	640 pb	55°C
<i>gpi</i>	Glicose-fofato isomerase	F-GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA R-TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC	456 pb	56°C
<i>rpoD</i>	Fator σ da RNA polimerase	F-ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG R-TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT	672 pb	55°C

Fonte: (BARTUAL et al., 2005).

Legenda: pb, pares de base; Y = C ou T.

Tabela 3 - Sequências nucleotídicas e temperaturas de anelamento dos *primers* utilizados na amplificação dos genes utilizados na técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) de acordo com o esquema Pasteur.

Genes	Fenótipo codificado	Sequência do iniciador (5'→3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento
<i>cpn60</i>	Glicose quinase	F-ACT GTA CTT GCT CAA GC R-TTC AGC GAT GAT AAG AAG TGG F-ATC GGT ATT TCT GCK CAC ATY GAT	405 pb	52°C
<i>fusA</i>	Fator de alongamento EF-G	R-CCA ACA TAC KYT GWA CAC CTT TGT T F-AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C	633 pb	51°C
<i>gltA</i>	Citrato Sintase	R-GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G F-GGT GTT GTT TCA TCA CTA GGW AAA GG	483 pb	55°C
<i>pyrG</i>	CTP sintase	R-ATA AAT GGT AAA GAY TCG ATR TCA CCM A	297 pb	50°C
<i>recA</i>	Fator de recombinação homólogo	F-CTG AAT CTT CYG GTA AAA C R-GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC	372 pb	55°C
<i>rplB</i>	Proteína ribossomal 50S L2	F-GTA GAG CGT ATT GAA TAC GAT CCT AAC C R-CAC CAC CAC CRT GYG GGT GAT C	330 pb	55°C
<i>rpoB</i>	Subunidade β da RNA polimerase	F-GGC GAA ATG GCD GAR AAC CA R-GAR TCY TCG AAG TTG TAA CC	456 pb	50°C

Fonte: (DIANCOURT et al., 2010).

Legenda: pb, pares de base; R, G ou A; Y, T ou C; D, A ou G ou T, Y = C ou T; K = G ou T; W = A ou T.

As sequências dos alelos foram analisadas e comparadas com aquelas já existentes no *website* para a determinação dos ST. Novos ST encontrados foram adicionados ao banco de dados. A construção dos grupos de similaridade entre os STs foi realizada pelo goeBURST (disponível em: <http://goeburst.phyloviz.net/>).

3.7 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

3.7.1 Método de disco-difusão em agar

Para a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o método de disco-difusão em agar, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Para isso, após o crescimento das cepas por 24 h a 37°C em meio AN, os inóculos foram padronizados em solução salina a 0,85% de acordo com a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). O inóculo padronizado foi semeado de forma confluyente em 3 direções diferentes, utilizando um *swab* estéril, em placas contendo o meio de Agar Mueller-Hinton (AMH), em um intervalo máximo de 15 min. Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina-sulbactam (10µg/10µg), piperacilina-tazobactam (100µg/10µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), imipenem (10µg) e meropenem (10µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25µg/23,75µg) e minociclina (30µg). Após incubação a 37°C por 20 h, os halos de inibição do crescimento bacteriano foram mensurados e interpretados de acordo com o CLSI (2019). Para o controle do teste foram utilizadas as cepas de referência *E. coli* INCQS n° 00033 (ATCC n° 25922) e *P. aeruginosa* INCQS n° 00099 (ATCC n° 27853).

As cepas foram classificadas segundo critérios de Magiorakos et al. (2012) em não-multirresistentes (n-MDR), MDR ou XDR (**Tabela 4**).

3.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da polimixina B (500.000 UI) (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, SP) das cepas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de poliestireno (Corning® Costar® - Sigma-Aldrich, catálogo n° 32190102), conforme recomendações do CLSI (2019), utilizando caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CMHCA) (CLSI, 2019). Para esse ensaio, a polimixina B foi diluída em água estéril e foram utilizadas

concentrações de polimixina B entre 64 µg/mL e 0,125 µg/mL, baseadas nos valores de corte recomendados pelo CLSI (2019). Primeiramente, 40 µL de CMHCA foram adicionados em todos os poços da microplaca. Posteriormente, 50 µL do antimicrobiano nas concentrações de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL foram adicionados aos poços da 1ª até a 11ª coluna, respectivamente.

Para o preparo do inóculo, após o crescimento das cepas por 24 h a 37°C em meio AN, os inóculos foram padronizados em solução salina a 0,85% de acordo com a escala 0,5 de McFarland. As suspensões padronizadas foram diluídas em 1:100 em CMHCA, de modo a se obter uma concentração final de células de aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Então, após a adição do CMHCA e das diferentes concentrações do antimicrobiano na microplaca, foram inoculados 10 µL da suspensão bacteriana diluída em cada poço, sendo uma cepa diferente em cada linha (A-H). A inoculação bacteriana dos poços foi realizada no intervalo de, no máximo, 30 min e posteriormente as placas foram homogeneizadas sobre a bancada em movimento rotatório e incubadas por 24 h a 37°C. Os poços da 11ª coluna foram utilizados como controle de esterilidade do antimicrobiano e os poços da 12ª coluna, foram utilizados como controle do crescimento bacteriano, pois foram inoculados com 10 µL de suspensão bacteriana diluída.

Tabela 4 - Classe dos antimicrobianos testados na avaliação da suscetibilidade das cepas de *A. baumannii*.

Classe	Antimicrobianos testados
β-lactâmicos	
Penicilinas	Ampicilina e Sulbactam Piperacilina e Tazobactam
Cefalosporinas 3ª geração	Cefotaxima Ceftazidima
Cefalosporinas 4ª geração	Cefepima
Carbapenemas	Imipenem Merepenem
Aminoglicosídeos	Amicacina Gentamicina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina
Inibidores da via do folato	Trimetoprim-sulfametoxazol
Tetraciclinas	Minociclina
Lipopeptídeos	Polimixina B

Fonte: (Anvisa, 2007).

As cepas de *E. coli* INCQS n° 00033 (ATCC n° 25922) e *P. aeruginosa* INCQS n° 00099 (ATCC n° 27853) foram utilizadas como controle do ensaio. A CIM foi determinada como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano.

3.8 Determinação dos fenótipos de resistência à polimixina B

3.8.1 Avaliação da heterorresistência

A heterorresistência das cepas susceptíveis à polimixina foi determinada por meio do perfil de análise populacional (PAP) descrito por Barin et al. (2013), com modificações. Para isso, após o crescimento das cepas por 24 h a 37°C em meio AN, os inóculos foram padronizados de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Então, 50 µL de cada inóculo padronizado nas concentrações de 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁴ UFC/mL foram semeados em placas contendo AMH com as seguintes diluições de polimixina B 0,5, 1, 2, 3 e 6 µg/mL e nas placas controle sem a adição do antimicrobiano. As colônias foram contadas após incubação por 48 h a 37°C, sendo o limite de contagem mínimo e o máximo de 20 UFC/mL e 400 UFC/mL, respectivamente (BARIN et al., 2013, YAU et al., 2009). A heterorresistência foi determinada pelo crescimento de colônias de *A. baumannii* em placas contendo a concentração de polimixina B pelo menos 2 vezes superior à população original (BARIN et al., 2013).

A frequência de subpopulações heterorresistentes na concentração mais elevada de antimicrobiano foi calculada dividindo o número de colônias que cresceram nas placas contendo antimicrobiano pelo número de colônias que cresceram na placa que continha a mesma concentração do inóculo de bactérias sem antimicrobiano (YAU et al., 2009).

Por fim, foi realizada a determinação da nova CIM à polimixina B das subpopulações heterorresistentes.

3.8.2 Avaliação da resistência adaptativa

Para a avaliação da resistência adaptativa, as cepas selecionadas foram padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland e submetidos a cultivos diários em placas de ágar Mueller-Hinton contendo concentrações crescentes de polimixina B compreendidas entre

0,25 e 64 µg/mL em um total de 9 dias (BARIN et al., 2013). Após, foi determinada a nova CIM como descrito no item 3.7.2.

3.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a técnica de PCR foram usados *primers* específicos para amplificar os genes *rpoB*, e os genes de resistência *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *ISAbal*, *ISAbal* – *bla*_{OXA-23} e *mcr-1* (**Tabela 5**). O aparelho utilizado para a realização das reações foi o termociclador DNA PTC-200-Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Massachusetts, EUA).

O DNA foi obtido como descrito no item 3.4 e empregado nas reações de PCR. Para a amplificação do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (LA SCOLA et al. 2006, GUNDI et al., 2009), das associações de *ISAbal* com *bla*_{OXA-23} (MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009) e do gene *mcr-1* para a detecção do gene de resistência à polimixina (LIU et al., 2016) foram realizadas reações individuais de PCR. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 3 µL de DNA (40 ng) adicionados de 0,5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 0,75 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM; MgCl₂), 0,5 µL de desoxiribonucleotídeo trifosfatado (0,2 mM; dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µL de cada *primer* (0,2 mM; **Tabela 5**), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As amplificações para o gene *rpoB* foram realizadas seguindo o programa: pré-desnaturação por 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30 seg a 52°C para desnaturação, 45 seg a 52°C para anelamento e 2 min a 72°C para extensão; extensão final de 5 min a 72°C. As amplificações para a sequência de inserção *ISAbal* foram realizadas seguindo o programa: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 5 min. Já as amplificações para *ISAbal* - *bla*_{OXA-23} foram realizadas seguindo o programa: pré-desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 45 seg, 58°C por 45 seg e 72°C por 3 min e 72°C por 5 min (TURTON et al., 2006). E as amplificações para o gene *mcr-1* foram realizadas seguindo o programa: pré-desnaturação a 94°C por 15 min, seguido por 25 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 90 seg, 72°C por 60 seg e 72°C por 10 min.

Foram realizadas reações de Multiplex-PCR, para a detecção dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143} (WOODFORD et al., 2006, HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010), de acordo com a metodologia descrita por Woodford et al. (2006), com algumas modificações. Para a amplificação de regiões específicas do genoma das

cepas de *A. baumannii*, a reação da Multiplex-PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L. A reação foi composta de 3 μ L de DNA (40 ng) adicionados de 2,5 μ L tampão Taq DNA polimerase (10X), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (1,5 mM), 0,5 μ L de cada dNTP (0,2 mM), 0,25 μ L de cada *primer* (0,2 mM; **Tabela 5**), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 25 seg, 52°C por 40 seg, 72°C por 50 seg e 72°C por 6 min.

Tabela 5 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).

Genes	Sequência do iniciador (5'→3')	Tamanho do fragmento	Referência
<i>rpoB</i>	F-TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G R-CMA CAC CYT TGT MCC RTGA	400 pb	GUNDI et al., 2009
<i>bla_{OXA-23}</i>	F-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501 pb	WOODFORD et al., 2006
<i>bla_{OXA-24}</i>	R-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA F-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	249 pb	WOODFORD et al., 2006
<i>bla_{OXA-51}</i>	R-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG F-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353 pb	WOODFORD et al., 2006
<i>bla_{OXA-58}</i>	F-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599 pb	WOODFORD et al., 2006
<i>bla_{OXA-143}</i>	F-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT R-TAA TCC TGA GGG GGC CAA CC	± 150 pb	WOODFORD et al., 2006
<i>ISAbal</i>	F-ATG CAG CGC TTC TTT GCA GG R-AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG	390 pb	MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009
<i>ISAbal - bla_{OXA-23}</i>	F- AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG R- TCA CAAC AAC TAA AAG CAC T	1456 pb	AFZAL-SHAH; WOODFORD; LIVERMORE, 2001, SEGAL; GARNY; ELISHA, 2005,
<i>mcr-1</i>	F-CGG TCA GTC CGT TTG TTC R-CTT GGT CGG TCT GTA GGG	1626 pb	LIU et al., 2016

Fonte: (AFZAL-SHAH; WOODFORD; LIVERMORE, 2001, SEGAL; GARNY; ELISHA, 2005, WOODFORD et al., 2006, GUNDI et al., 2009, MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009, LIU et al., 2016)
Legenda: pb, pares de base; R, G ou A; Y, T ou C; M, A ou C.

A corrida eletroforética para detecção dos amplicons gerados foi realizada como descrito posteriormente no item 3.5. A purificação dos amplicons obtidos e a determinação das sequências nucleotídicas foi realizada de acordo com o item 3.6.

Foram utilizados como controles positivos, cepas de *A. baumannii* do acervo interno do Setor Saneantes (*rpoB*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *ISAbal*, *ISAbal - bla_{OXA-23}*); da coleção de

cultura de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) do IOC (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}) e a cepa *E. coli* C153 (*mcr-1*), doada gentilmente pela Dr^a. Renata Cristina Picão, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ROCHA et al., 2017).

3.10 Estudo da formação de biofilme

A quantidade de biofilme formado pelas cepas de *A. baumannii* foi avaliada por meio do ensaio de formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços (Nuncclon™ - Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo n° 269787), realizado de acordo com Moskowitz et al. (2004), com algumas modificações.

A partir do crescimento por 18-24 h a 37°C em AN, o inóculo foi padronizado em caldo LB, de acordo com a escala 0,5 de McFarland e 100 µL foram transferidos para os poços da microplaca de 96 poços, que foi incubada por 18-24 h a 37°C. Cada cepa foi testada em hexaplicata. Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 100 µL de água destilada, para retirada das bactérias em suspensão. Então, o biofilme formado foi corado com 100 µL de solução aquosa de cristal violeta 0,1% e incubado por 15 min à temperatura ambiente, sendo novamente lavado 3 vezes com 100 µL de água destilada, para retirada do excesso de cristal violeta. A microplaca foi deixada à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h para secagem e para solubilizar o cristal violeta adsorvido, foram adicionados 150 µL de etanol 95% por 15 min à temperatura ambiente. Por fim, a microplaca foi submetida a espectrofotômetro para medir a absorbância a 590nm.

A. baumannii ATCC 19606 foi utilizado como controle positivo. Os poços com meio de cultura não inoculado foram considerados como controles negativos. Também foi incluída a cepa de *E. coli* K-12, considerada um fraco formador de biofilme.

Os biofilmes foram classificados como: não formador de biofilme ($DO \leq DOc$), fraco ($DOc < DO \leq 2x DOc$), moderado ($2x DOc < DO \leq 4x DOc$) e forte ($DO \geq 4x DOc$). Sendo DO, a densidade óptica obtida após a leitura das cepas no espectrofotômetro e DOc, a média da DO do controle negativo (STEPANOVIC et al., 2000).

3.11 Estudo da natureza do biofilme

Para o estudo da natureza do biofilme, cepas capazes de formar biofilme forte foram submetidos a diferentes tratamentos. Os tratamentos foram realizados sobre o biofilme já

formado na superfície de poliestireno. Para pesquisarmos o envolvimento de polissacarídeos na formação do biofilme, foi utilizada uma solução de metaperiodato de sódio a 40 mM (acetato de sódio 500 mM e periodato de sódio 40 mM pH 4,5; oxidante de carboidratos) (WANG; PRESTON; ROMEO, 2004); para o envolvimento de DNA na constituição do biofilme, foi utilizada DNase I (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (SAHU et al., 2012); e para o envolvimento de proteínas foi utilizada proteinase K (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (SAHU et al., 2012).

Para isso, após realizarmos as etapas para formação do biofilme em microplacas de poliestireno como descrito no item 3.9, os poços da microplaca foram lavados com água destilada. Então, o biofilme foi tratado por 2 h ou 24 h a 37°C, com metaperiodato de sódio, DNase I ou proteinase K, nas concentrações já descritas. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado, o biofilme foi lavado novamente com água destilada e corado com cristal violeta para a leitura em espectrofotômetro a 590 nm.

A classificação dos biofilmes foi realizada como descrito no item 3.9 segundo Stepanovic et al. (2000). E os resultados obtidos nesse ensaio após leitura em espectrofotômetro foram comparados com os resultados obtidos no ensaio de formação de biofilme.

3.12 Avaliação dos efeitos de etanol na formação de biofilme

Para avaliar o efeito do etanol na formação de biofilme de *A. baumannii* foram utilizadas cepas capazes de formar biofilme forte, moderado, fraco e cepas não aderentes. Para isso, após realizarmos as etapas para formação do biofilme em microplacas de poliestireno como descrito no item 3.9, os poços da microplaca foram lavados com água destilada. Então, ao biofilme formado foi adicionado etanol 2% e, logo depois, a microplaca foi levada para estufa por 1 h a 37°C, segundo Nwugo et al. (2012), com modificações. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado, o biofilme foi lavado novamente com água destilada e corado com cristal violeta para a leitura em espectrofotômetro a 590 nm.

A classificação dos biofilmes foi realizada como descrito no item 3.9 segundo Stepanovic et al. (2000). Os resultados obtidos nesse ensaio após leitura em espectrofotômetro foram comparados com os resultados obtidos no ensaio de formação de biofilme.

3.13 Microscopia de Varredura Confocal à Laser (MVCL)

Foram selecionadas cinco cepas, duas classificadas como formadoras de biofilme forte (23SAN e 69SAN), uma como biofilme moderado (120SAN), uma como biofilme fraco (136SAN) e uma última classificada como não aderente (131SAN) para a observação das estruturas tridimensionais dos biofilmes formados por MVCL. Os tratamentos para avaliação da natureza do biofilme foram realizados utilizando apenas a cepa (69SAN) previamente classificada como formadora de biofilme forte. Para a visualização da estrutura do biofilme após a adição de etanol 2% foi selecionada igualmente uma cepa (171SAN) previamente classificada como não aderente.

Para isso, o ensaio do biofilme foi realizado em placas para cultura celular com fundo de vidro (Greiner Bio-One, Brasil). O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.10 e 1 mL desse crescimento padronizado transferido para as placas, as quais foram incubadas por 24 h a 37°C. As cepas submetidas aos tratamentos com metaperiodato de sódio, DNase I e proteinase K foram preparadas como descrito no item 3.11 e aquelas submetidas ao tratamento com etanol 2% foram preparadas como descrito 3.12.

Para a avaliação por microscopia confocal, após incubação das placas, o sobrenadante contendo as células não aderentes foi removido e em seguida, o biofilme foi tratado ou não. A seguir, as placas foram coradas com 50 µL de corante de viabilidade *Live/Dead BacLight* (Invitrogen, Eugene, OR, USA) de acordo com as instruções do fabricante e mantidas no escuro até sua análise. O reagente SYTO9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio com fluorescência vermelha permitiu a visualização das bactérias mortas. A análise da estrutura do biofilme formado por *A. baumannii* foi realizada no microscópio de varredura confocal à laser Leica TCS-SPE (Leica, Germany) e as imagens geradas foram analisadas por *software* LAS X.

Este estudo foi realizado na Unidade Multiusuária de Microscopia Confocal, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade federal do Rio de Janeiro, como o auxílio da Dra. Grasiela Ventura.

3.14 Análise estatística

Os resultados obtidos no estudo de formação de biofilme em microplacas de poliestireno, estudo da natureza do biofilme e na avaliação dos efeitos de etanol na formação de biofilme foram analisados pelo teste do valor extremo (Grubbs), onde P valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.15 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, através da Plataforma Brasil e foi aprovado segundo registro 34239614.5.0000.5248.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da identificação das cepas

Foram realizados testes bioquímicos convencionais para todas as cepas oriundas dos dois hospitais da rede pública do Rio de Janeiro. Esses testes foram importantes na primeira etapa de confirmação da identificação desses isolados. Como resultado, todas as 76 cepas analisados foram identificadas como pertencentes ao Complexo Acb.

Para a identificação das cepas ao nível de espécie, houve a necessidade de se realizar uma identificação molecular por meio da amplificação por PCR e sequenciamento do fragmento do gene *rpoB*. Por meio dessa metodologia foram identificadas 72 cepas como *A. baumannii* (similaridade $\geq 98\%$). Quatro cepas foram identificadas como *A. nosocomialis* (similaridade $\geq 98\%$), sendo retiradas do estudo.

4.2 Distribuição das cepas

Dentre as 72 cepas de *A. baumannii* estudadas, a maioria (n = 60; 87%) foi proveniente do Hospital 1 (**APÊNDICE A** e **APÊNDICE C**).

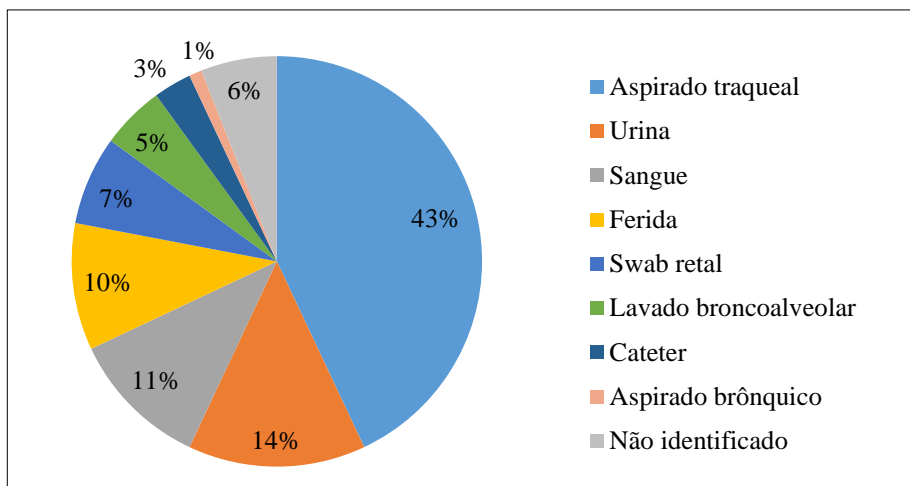
As 72 cepas de *A. baumannii* foram coletadas a partir de diferentes sítios, sendo a maioria (43%; n = 31) oriunda de aspirado traqueal, seguido de urina (14%; n = 10), sangue (11%; n = 8), ferida (10%; n = 7), *swab* retal (7%; n = 5), lavado broncoalveolar (5%; n = 14), cateter (3%; n = 2) e aspirado brônquico (1%; n = 1). Não foi identificado o sítio de coleta de apenas 6% (n = 4) das cepas coletadas (**Figura 1**).

Das 60 cepas coletadas no Hospital 1, a maioria foi oriunda de aspirado traqueal (42%; n = 29) e das 12 cepas coletadas no Hospital 2, a maioria foi oriunda de *swab* retal (42%; n = 5).

4.3 Avaliação do polimorfismo genético por PFGE

Todas as 72 cepas de *A. baumannii* foram submetidas à análise do polimorfismo genético por meio da técnica de PFGE, após restrição total do DNA com a endonuclease de restrição *Apal* (**APÊNDICE A** e **APÊNDICE C**).

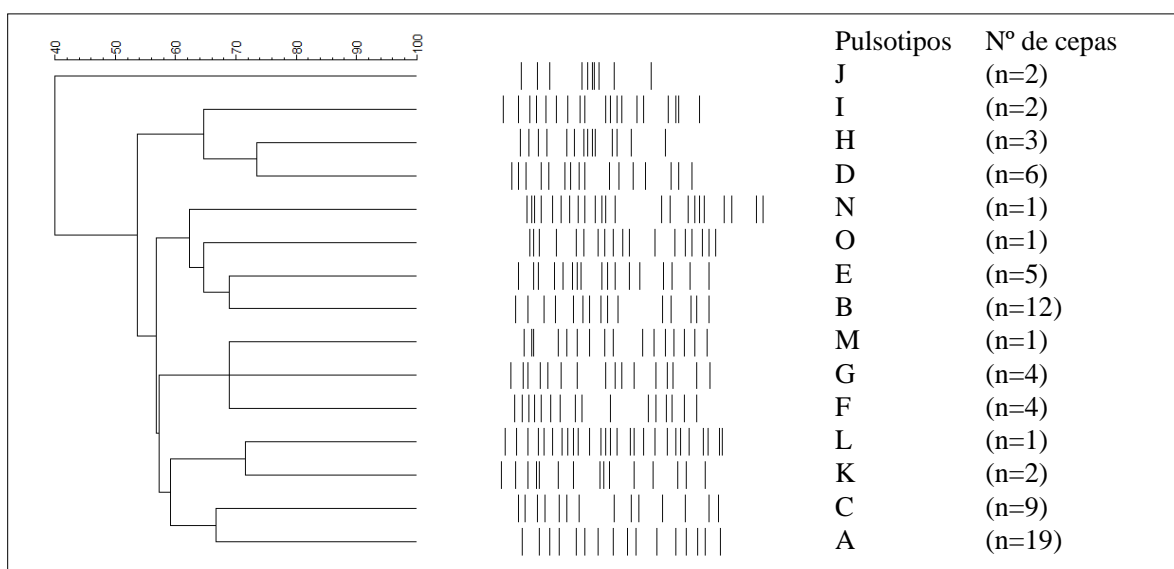
Figura 1 - Distribuição em porcentagem das 72 cepas de *A. baumannii* coletadas dos dois hospitais da rede pública do Rio de Janeiro.



Fonte: (GENTELUCI, 2020)

Foi observado um total de 15 pulsotipos (A ao O) com 85% de similaridade. O pulsotipo A representado por 26% (n = 19) das cepas foi o mais prevalente; seguido do pulsotipo B, 17% (n = 12) das cepas; pulsotipo C, 13% (n = 9) das cepas; pulsotipo D, 8% (n = 6) das cepas; pulsotipo E, 7% (n = 5) das cepas; pulsotipo F e G, 6% (n = 4) das cepas, cada; pulsotipo H, 4% (n = 3) das cepas, os pulsotipos de I ao K foram representados por duas cepas cada, 3% (n = 2); e os demais pulsotipos, de L ao O, foram representados por apenas uma cepa, 1% (n = 1), cada (**Figura 2**).

Figura 2 - Dendrograma gerado pelas análises de DICE/UPGMA (Bionumerics versão 4.6, Applied Maths) das cepas de *A. baumannii*. Os padrões das bandas foram detectados por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *Apal*.



Fonte: (GENTELUCI, 2020)

Os pulsotipos A, D, E, G e J estavam presentes nos dois hospitais estudados, já os demais estavam presentes em apenas um deles. A maioria das cepas pertencentes ao pulsotipo A estavam no Hospital 1 (n = 16) e a maioria das cepas pertencentes ao pulsotipo D estavam no Hospital 2 (n = 5).

Após correlacionarmos o sítio de coleta das cepas com os perfis de PFGE, foi observado que entre as cepas pertencentes aos pulsotipos A, B, C, D e E, a maioria foi coletada de aspirado traqueal, 37% (n = 7), 67% (n = 8), 56% (n = 5), 50% (n = 3), 60% (n = 3), respectivamente. Nas cepas do pulsotipo F, a maioria foi coletada de ferida (50%; n = 2), nas cepas pertencentes aos pulsotipos G e H, o sítio prevalente foi urina (50%; n = 2 e 67%; n = 2, respectivamente). Para os pulsotipos que foram representados por uma ou duas cepas (I ao O), as cepas foram coletadas de aspirado traqueal, urina, ferida, *swab* retal e aspirado brônquico.

4.4 Tipagem por MLST

Para a realização do MLST foram selecionadas nove cepas pertencentes aos pulsotipos A (n=2), B (n=2), C (n=1), D (n=1), E (n=1), F (n=1) e G (n=1). As **Figuras 3 e 4** apresentam os agrupamentos dos ST identificados por meio do esquema Oxford e Pasteur por *goeBurst*, respectivamente. Nessas figuras estão representados todos os ST presentes na base de dados do PUBMLST (Oxford e Pasteur), até o momento, e os ST das cepas incluídas no presente estudo, bem como de seus respectivos CC.

De acordo com o esquema Oxford foram determinados sete ST e quatro CC, sendo três ST: ST229 (n = 1), ST231 (n = 2) e ST235 (n = 1) considerados também CC. Além disso, os ST133 (n = 1) e ST438 (n = 1) pertenceram ao CC103, o ST2097 (n = 1) pertenceu ao CC231 e o ST305 (n = 2), ao qual não foi atribuído nenhum CC, foi chamado de *singleton* (**Figura 3**).

As análises dos diferentes alelos mostrou que as cepas pertencentes ao CC103 (ST133 e 438) variaram apenas no *locus gpi*, sendo consideradas *single-locus variant*. Assim como as cepas pertencentes ao CC231 (ST231 e 2097), que também variaram no *locus gpi*, foram consideradas *single-locus variant*.

O ST2097, de acordo com o esquema Oxford, é descrito pela primeira vez neste estudo e foi depositado no banco de dados do MLST, disponível no endereço eletrônico:

<https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_abaumannii_oxford_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=1>, acesso em 24/03/2020.

De acordo com o esquema Pasteur, foram determinados oito ST e cinco CC, sendo dois ST: ST15 (n = 1) e ST162 (n = 1) considerados também CC. Além disso, o ST103 (n = 1) pertenceu ao CC213, os STs160 (n = 1), 986 (n = 1) e 1439 (n = 1) pertenceram ao CC1, ST 188 (n = 2) pertenceu ao CC10 e ST 330 (n = 1) pertenceu ao CC15 (**Figura 4**).

As análises dos diferentes alelos mostraram que duas cepas (ST986 e 1439) pertencentes ao CC1 variaram em um locus *cpn60*, sendo consideradas *single-locus variant*, e uma cepa (ST160) pertencente ao mesmo CC variou em dois loci, *cpn60* e *rpoB*, sendo considerada *double-locus variants*. Além disso, as cepas ST15 e 330 pertencentes ao CC 15 variaram apenas no locus *cpn60*, sendo consideradas *single-locus variant*.

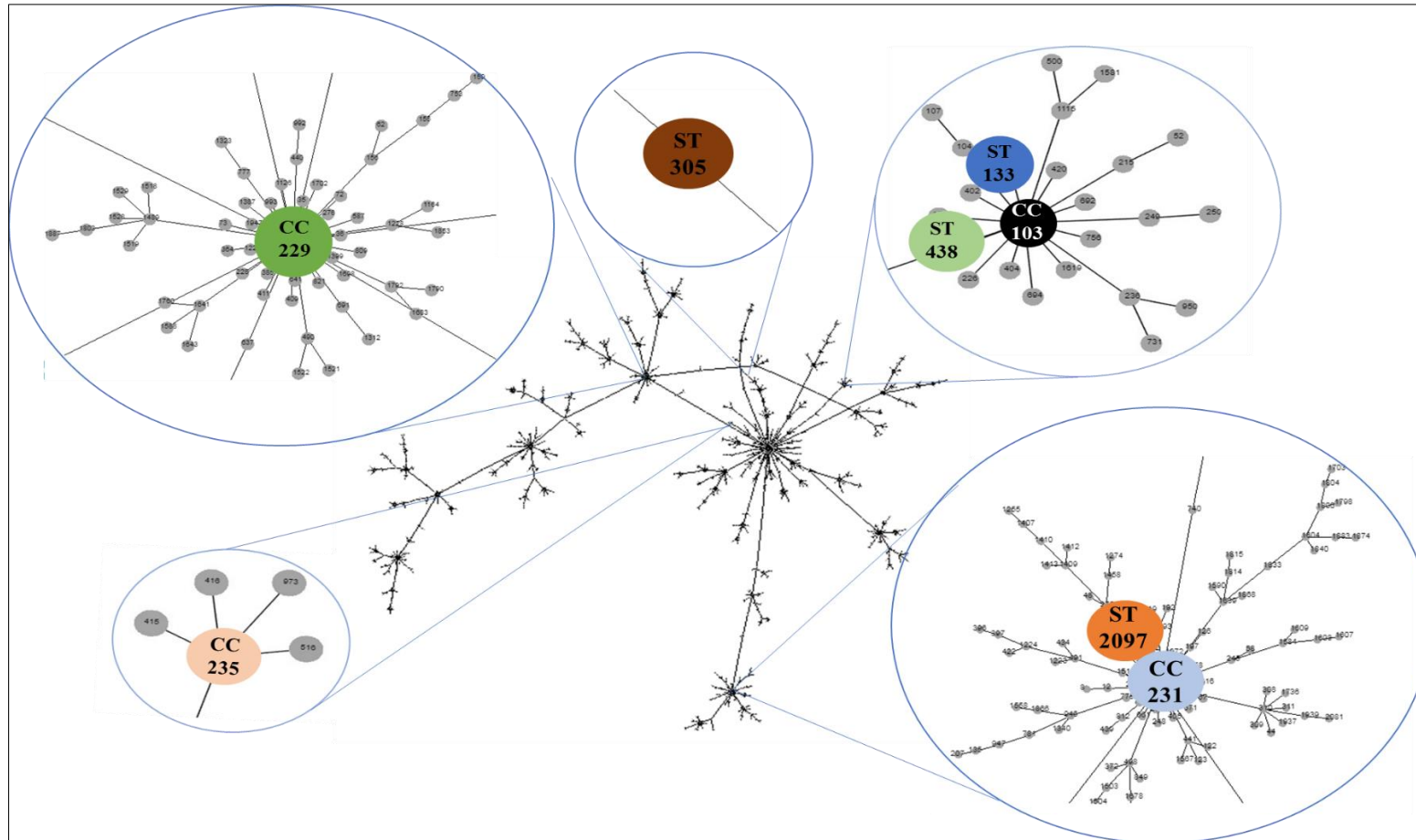
O ST1439 foi descrito pela primeira vez neste estudo e foi depositado no banco de dados do MLST Pasteur, disponível no endereço eletrônico: <https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=2>, acesso em 24/02/2020.

Pelo esquema Oxford foi possível identificar que uma cepa pertencente ao pulsotipo A apresentou ST133 e a outra pertencente ao mesmo pulsotipo apresentou ST438; as duas cepas pertencentes ao pulsotipo B apresentaram ST305; a cepa pertencente ao pulsotipo C apresentou ST231; a cepa pertencente ao pulsotipo D apresentou ST231; a cepa pertencente ao pulsotipo E apresentou ST235; a cepa pertencente ao pulsotipo F apresentou ST2097; e a cepa pertencente ao pulsotipo G apresentou ST103 (**Tabela 6**).

Pelo esquema Pasteur foi possível identificar que uma cepa pertencente ao pulsotipo A apresentou ST15 e a outra pertencente ao mesmo pulsotipo apresentou ST330; as duas cepas pertencentes ao pulsotipo B apresentaram ST188; a cepa pertencente ao pulsotipo C apresentou ST936; a cepa pertencente ao pulsotipo D apresentou ST231; a cepa pertencente ao pulsotipo E apresentou ST1439; a cepa pertencente ao pulsotipo F apresentou ST 103; e a cepa pertencente ao pulsotipo G apresentou ST229 (**Tabela 6**).

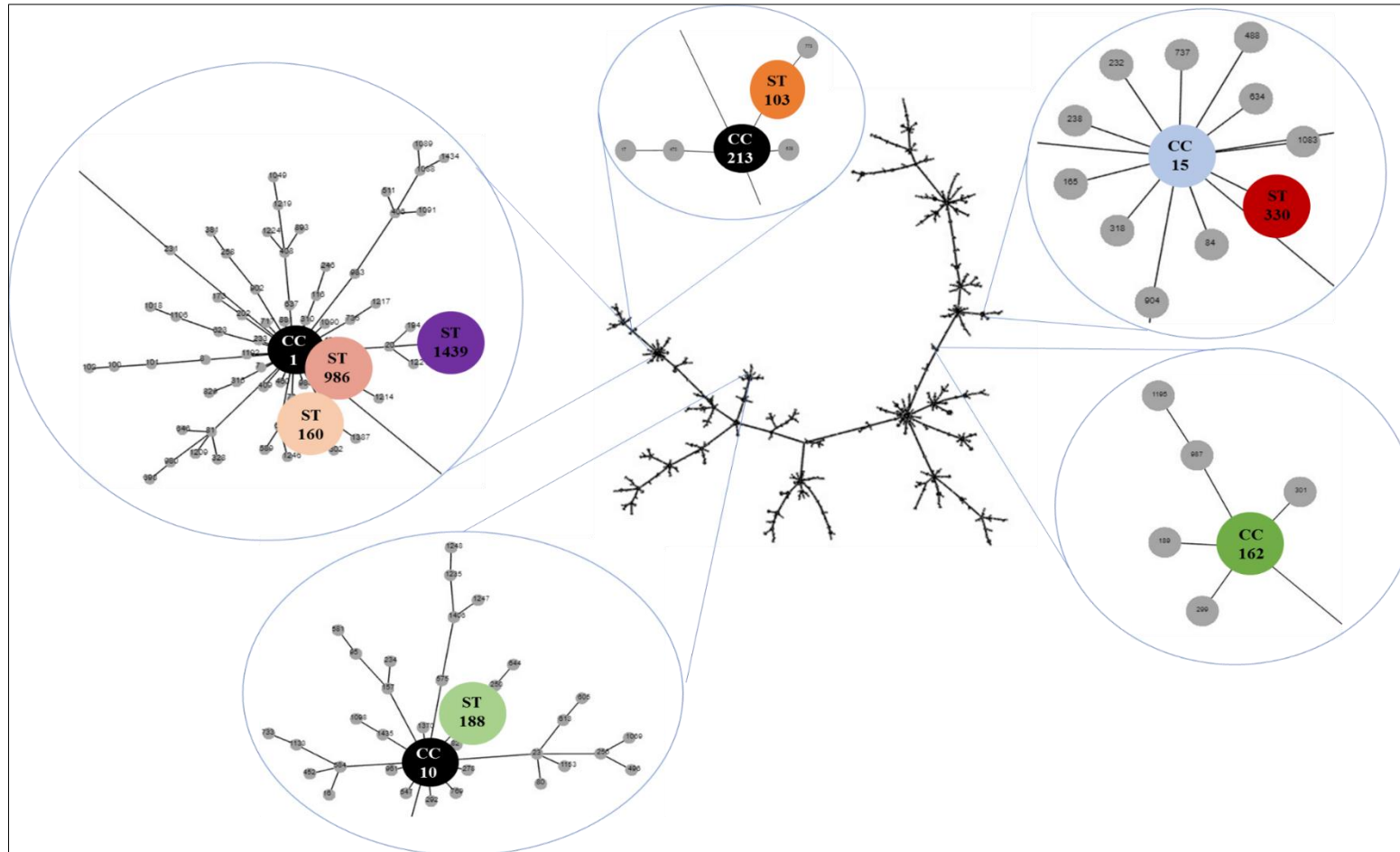
De acordo com o esquema Oxford e Pasteur foi possível observar a presença de mesmos CC nos dois hospitais estudados, CC231 no caso do esquema Oxford e CC1 no caso do esquema Pasteur. Além disso, observamos que as duas cepas agrupadas pelo PFGE no pulsotipo A (15SAN e 69SAN) foram agrupadas em dois ST distintos pelos dois esquemas de MLST (Oxford e Pasteur) (**Tabela 6**).

Figura 3 - Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no *software* PhyloViz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os *Sequence Types* (ST) de acordo com o esquema Oxford. Os Complexos Clonais (CC) e os ST observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores, 24/03/2020.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Figura 4 - Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no *software* PhyloViz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os *Sequence Types* (ST) de acordo com o esquema Pasteur. Os Complexos Clonais (CC) e os ST observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores, 24/02/2020.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Tabela 6 - *Sequence typings* (ST) das cepas de *A. baumannii* segundo os esquemas Pasteur e Oxford e a relação com os pulsotipos identificados pelo Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Cepas	PFGE	Origem	<i>Sequence typing</i> (ST)Complexo clonal (CC)	
			Oxford	Pasteur
15SAN	A	Hospital 1	133/103	15/15
69SAN		Hospital 1	438/103	330/15
62SAN	B	Hospital 1	305/ <i>singleton</i>	188/10
100SAN		Hospital 1	305/ <i>singleton</i>	188/10
34SAN	C	Hospital 1	231/231	986/1
74SAN	D	Hospital 2	231/231	1439/1
23SAN	E	Hospital 1	235/235	162/162
107SAN	F	Hospital 1	2097/231	160/1
115SAN	G	Hospital 2	229/229	103/213

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

4.5 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que 99% (n = 71) das cepas apresentaram resistência à cefotaxima, 97% (n = 70) à cefepima, 96% (n = 69) ao trimetoprim-sulfametoxazol, à ciprofloxacina, ao imipenem e ao meropenem, 93% (n = 67) à piperacilina/tazobactam, 90% (n = 65) à ampicilina/sulbactam e 83% (n = 60) à ceftazidima. Os maiores percentuais de suscetibilidade foram observados para amicacina, gentamicina e minociclina (53%, 64% e 100%, respectivamente) (**Figura 5**) (**APÊNDICE C**).

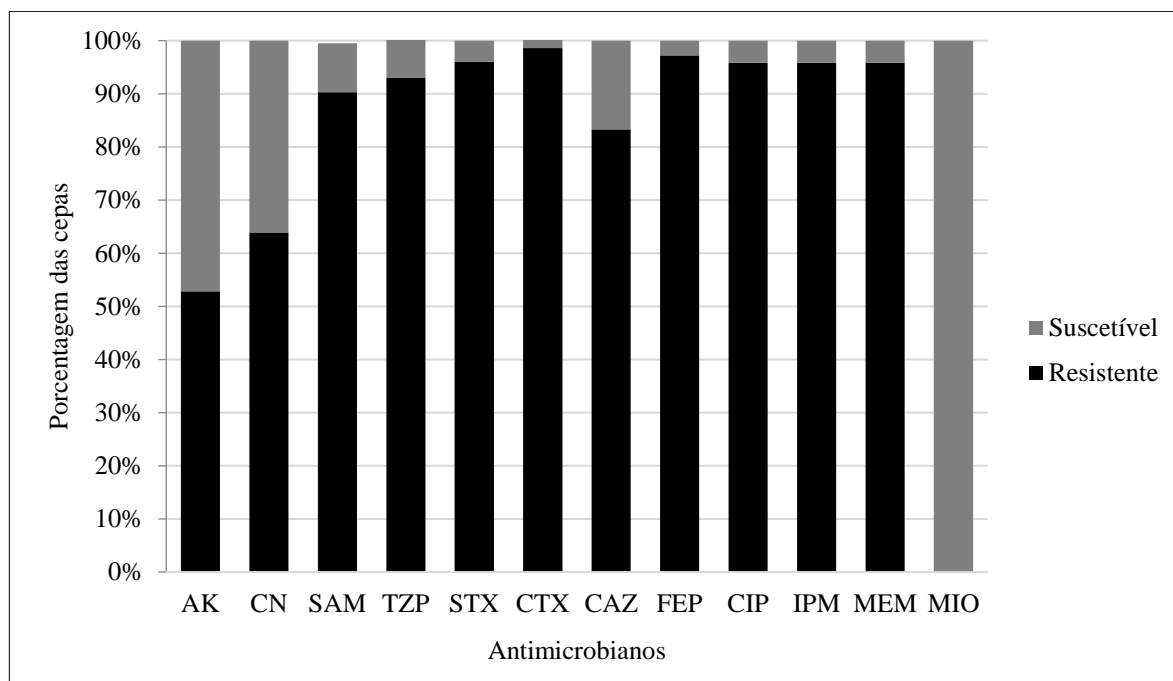
A CIM da polimixina B frente as diferentes cepas foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2019). Por esse método, foi observado que a maioria das cepas era suscetível a esse antimicrobiano (81%; n = 58), apresentando CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. Catorze cepas foram consideradas resistentes à polimixina B (19%) apresentando valores de CIM entre 4-128 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 6**).

As cepas foram classificadas em não-multirresistentes a drogas (n-MDR), MDR e XDR, de acordo com o fenótipo de resistência às classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). No presente estudo, foram encontradas apenas duas cepas de *A. baumannii* com o fenótipo n-MDR (2SAN e 4SAN), 45 cepas (62%) apresentaram fenótipo MDR e 25 cepas (35%) apresentaram fenótipo XDR (**APÊNDICE B**).

A partir dos perfis de resistência aos antimicrobianos foi observado que o maior número de cepas (n = 16) está agrupado no perfil que apresenta suscetibilidade apenas à

minociclina e polimixina B. O segundo perfil que agrupa o maior número de cepas ($n = 12$) é o que apresenta suscetibilidade apenas à amicacina, minociclina e polimixina B. Três cepas foram suscetíveis apenas a minociclina (**Tabela 7**).

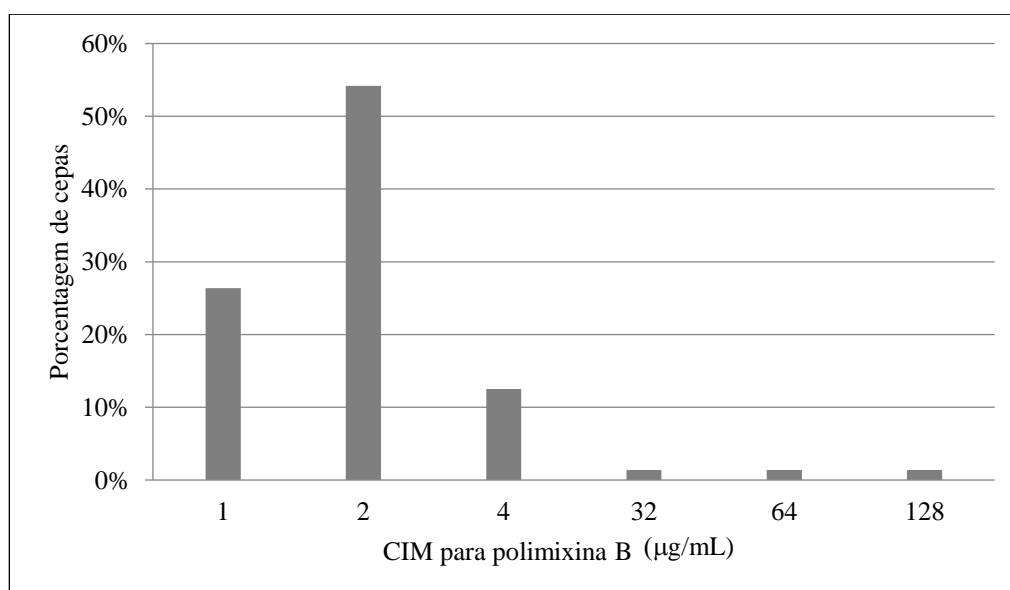
Figura 5 - Frequência de resistência aos antimicrobianos das 72 cepas de *A. baumannii*.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: AK, amicacina; CN, gentamicina; SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; ME, meropenem; MIO, minociclina. *As cepas que apresentaram resistência intermediária foram considerados resistentes.

Figura 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B das 72 cepas de *A. baumannii*.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

As cepas que apresentaram resistência aos carbapenemas foram coletadas de diversos sítios. Porém, observamos que a maioria das cepas resistentes à polimixina B (n = 14) foi coletada de aspirado traqueal (43%, n = 6).

Tabela 7 - Perfis de resistência aos antimicrobianos com o respectivo número de cepas de *A. baumannii*.

Perfil de resistência aos antimicrobianos	Nº de cepas resistentes
AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	3
AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	16
AK, SAM, TZP, CTX, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	3
CN, SAM, TZP, CTX, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	2
AK, CN, TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	1
SAM, TZP, CTX, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	2
CN, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, PB	1
CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	12
AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, FEP, CIP, IPM, MER	6
AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	8
CN, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1
CN, SAM, TZP, STX, CTX, FEP, CIP, IPM, MER	3
SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	7
AK, SAM, TZP, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1
TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1
STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1
SAM, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP	1
CN, SAM, TZP, STX, CTX	1
IPM, MER, PB	1
CTX, PB	1

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: AK, amicacina; CN, gentamicina, SAM, ampicilina/sulbactam; CAZ, ceftazidima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; FEP, cefepima; TZP, piperacilina/tazobactam; CIP, ciprofloxacina; CTX, cefotaxima; PB, polimixina B.

As cepas classificadas como n-MDR (n = 2) foram coletadas de aspirado traqueal e sangue. Uma cepa n-MDR (2SAN), coletada de aspirado traqueal, apresentou resistência apenas aos carbapenemas e à polimixina B. A outra cepa que também foi classificada como

n-MDR (4SAN), coletada de sangue, apresentou resistência apenas à cefotaxima e à polimixina B. Dentre as cepas classificadas como XDR (n = 25) e MDR (n = 45), a maioria foi coletada de aspirado traqueal, (64%, n = 16 e 31%, n = 14, respectivamente).

Por meio do PFGE, observamos que as cepas n-MDR (n = 2) foram agrupadas em pulsotipos esporádicos (G e M). Nas classificações MDR e XDR, atribuídas a maioria das cepas estudadas, estavam representantes de diversos pulsotipos, tanto predominantes quanto esporádicos.

As cepas resistentes aos carbapenemas (n = 80) foram agrupadas em diversos pulsotipos, já as cepas suscetíveis a esses antimicrobianos (n = 3) foram agrupadas em três pulsotipos distintos (G, E e O). As cepas resistentes à polimixina B (n = 14) foram agrupadas em seis pulsotipos (A, B, C, E, G, M e N). É importante destacar que a maioria das cepas resistentes à polimixina B (n = 4) se agrupou no pulsotipo A, que possuía o maior número de cepas (n = 19).

4.6 Análise do perfil populacional (PAP)

Foi realizada a pesquisa de heterorresistência à polimixina B em 58 cepas de *A. baumannii* suscetíveis à esse antimicrobiano. Como resultado, observamos que em 21 (36%) cepas selecionadas foi detectada a heterorresistência à polimixina B (**APÊNDICE A** e **APÊNDICE C**).

Além disso, a frequência de subpopulações heterorresistentes foi calculada e observamos uma variação de $0,3 \times 10^{-7}$ a $0,4 \times 10^{-4}$. As CIM da polimixina B das colônias heterorresistentes variaram tanto para mais quanto para menos que a CIM da população original. Em sete cepas a CIM da polimixina B das colônias heterorresistentes permaneceram maiores que a CIM da população original, em sete permaneceram a mesma CIM que a população original e por fim, sete demonstraram CIM menor que a população original (**Tabela 8**).

Entre as cepas que apresentaram heterorresistência, foi demonstrada que a maioria delas foi coletada de aspirado traqueal (52%, n = 11). A heterorresistência à polimixina B não foi relacionada a um pulsotipo específico, já que essa característica estava presente em diversos pulsotipos, tanto predominantes como esporádicos. Por fim, seis cepas (29%) (70SAN, 71SAN, 74SAN, 130SAN, 135SAN e 136SAN) que apresentaram heterorresistência também foram classificadas como XDR.

Na avaliação da resistência adaptativa à polimixina B, as mesmas 58 cepas susceptíveis à polimixina B foram selecionadas. Porém essa característica não foi observada em nenhuma delas, já que nenhuma cresceu em concentrações de polimixina B superiores a 2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 8 - Tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), sítio de coleta, perfil de resistência e análise populacional das 21 cepas de *A. baumannii* com heterresistência à polimixina B.

PFGE	Sítio de coleta	Perfil de resistência	CIM PB original (µg/mL)	CIM heterorresistência (µg/mL)	Frequência de subpopulações HR	CIM PB das colônias HR (µg/mL)
A	Aspirado traqueal	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0,4 X 10 ⁻⁴	2
	Lavado broncoalveolar	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0,4 X 10 ⁻⁶	8
	Aspirado traqueal	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2,0 X 10 ⁻⁶	1
	Cateter	AK, SAM, TZP, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1,0 X 10 ⁻⁶	0,25
C	Aspirado traqueal	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1,8 X 10 ⁻⁶	2
	Aspirado traqueal	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2,0 X 10 ⁻⁶	16
	Cateter	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0,4 X 10 ⁻⁶	1
D	Aspirado traqueal	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1,4 X 10 ⁻⁶	0,5
	Aspirado traqueal	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1,7 X 10 ⁻⁶	1
	Aspirado traqueal	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0,7 X 10 ⁻⁶	8
	Swab retal	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	3	2,4 X 10 ⁻⁶	2
E	Aspirado traqueal	CN, SAM, TZP, STX, CTX	2	6	2,0 X 10 ⁻⁶	0,5
F	Urina	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0,7 X 10 ⁻⁶	0,25
G	Urina	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0,3 X 10 ⁻⁷	4
H	Urina	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1,2 X 10 ⁻⁶	4
	Urina	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2,2 X 10 ⁻⁶	0,125
I	Aspirado traqueal	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2,0 X 10 ⁻⁶	2
J	Ferida	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1,2 X 10 ⁻⁶	1
K	Aspirado traqueal	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1,3 X 10 ⁻⁶	2
	Aspirado traqueal	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0,3 X 10 ⁻⁶	1
L	Aspirado brônquico	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1,3 X 10 ⁻⁶	4

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: AK, ampicacina; CN, gentamicina, SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam, STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CTX, cefotaxima, CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima, CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MER, meropenem; MIO, minociclina; PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, CIM, concentração mínima inibitória; PB, polimixina B; HR, cepa heterorresistente a polimixina B.

4.7 Pesquisa de genes de oxacilinas, sequência de inserção e do gene *mcr-1*

Nas 72 cepas de *A. baumannii* foram pesquisados os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}, a sequência de inserção *ISAbal*, *ISAbal* associada ao gene *bla*_{OXA-23} e o gene *mcr-1* (**APÊNDICE B**).

Todas as 72 cepas apresentaram os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}, incluindo as 3 cepas (4SAN, 40SAN e 119SAN) susceptíveis aos carbapenemas. Em uma cepa (2SAN) foi detectado o gene *bla*_{OXA-24}, nela também foi encontrada resistência aos carbapenemas e à polimixina B, como descrito anteriormente. Após o sequenciamento e a análise da sequência referente ao gene *bla*_{OXA-24} encontrado na cepa 2SAN, foi possível observar que a sequência era do gene *oxa-72* que está englobado na família *bla*_{OXA-24} (similaridade $\geq 99\%$). Nenhum outro gene de oxacilinas foi detectado nas cepas.

A sequência de inserção *ISAbal* foi detectada em todas as cepas, diferente da *ISAbal* adjacente ao gene *bla*_{OXA-23}. Essa associação foi observada na maioria das cepas (96%, n = 69), apenas três não possuíam essa associação, dentre elas, 40SAN e 119SAN, cepas susceptíveis aos carbapenemas que possuíam o gene *bla*_{OXA-23} e a cepa 78SAN, cepa resistente aos carbapenemas. As cepas que não possuíam a associação *ISAbal* - *bla*_{OXA-23} pertenceram a pulsotipos esporádicos (D, E e O).

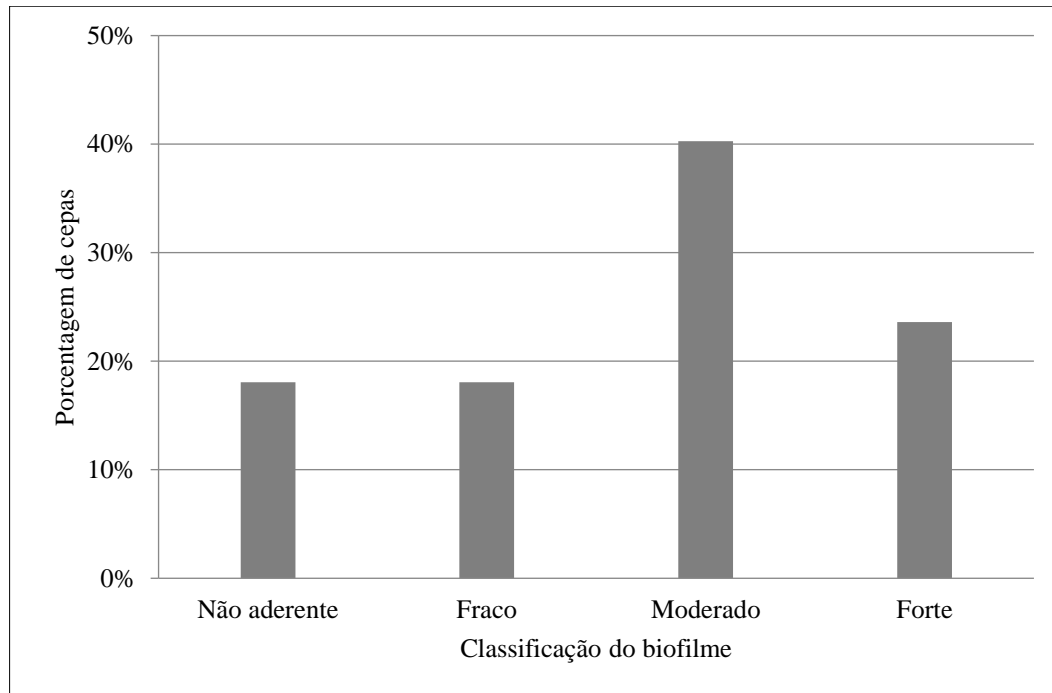
Por fim, o gene *mcr-1* não foi encontrado nas cepas estudadas.

4.8 Ensaio de formação de biofilme

Na avaliação da formação de biofilme, as cepas foram classificadas em formadoras de biofilme forte, moderado, fraco e não formadoras de biofilme, após coloração com cristal violeta e solubilização do biofilme com etanol (**APÊNDICE A**).

A média da Densidade Óptica (DO) das 72 cepas estudados variou de 0,004 a 1,775. O ponto de corte da DO para o teste foi definido como a DO do controle negativo (DOc) que foi de 0,246. As cepas foram agrupadas em não formador ($DO < 0,246$), fraco ($0,246 < DO \leq 0,492$), moderado ($0,492 < DO \leq 0,984$) e forte ($DO > 0,984$). Observamos que a maioria das cepas (82%, n = 59) foi capaz de formar biofilme, sendo 18% (n = 13) das cepas capazes de formar biofilme fraco, 40% (n = 29) biofilme moderado e 24% (n = 17) biofilme forte. Apenas 18% (n = 13) das cepas não foram capazes de formar biofilme (**Figura 7**).

Figura 7 - Classificação das 72 cepas de *A. baumannii* quanto o tipo de formação de biofilme.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Ao relacionarmos o sítio de coleta das cepas com a formação de biofilme, observamos que a maioria das cepas coletadas de aspirado traqueal foi capaz de formar biofilme forte (65%, $n = 20$). Além disso, foi observado que todas as cepas coletadas de urina, ferida, lavado broncoalveolar e cateter foram capazes de formar biofilme.

Foi possível correlacionar a formação de biofilme com o pulsotipo prevalente A ($n = 19$), já que dentre as cepas pertencentes a esse pulsotipo, apenas três não foram capazes de formar biofilme. Porém, dentre as cepas que não formaram biofilme ($n = 13$) a maioria também pertencia à pulsotipos prevalentes (A e B, 58%, $n = 11$), as demais pertenciam aos pulsotipos esporádicos C, E, G, K, L e N.

Não foi possível avaliar uma relação entre as cepas MDR e XDR com a formação de biofilme forte ou com cepas não aderentes já que no presente estudo a maioria das cepas pertencia a esse fenótipo.

4.9 Avaliação da natureza do biofilme de *A. baumannii*

A partir dos resultados obtidos no ensaio de formação de biofilme foram selecionadas as 17 cepas capazes de formar biofilme forte para a caracterização da natureza do biofilme.

Após 2 h de tratamento com proteinase K (1 mg/mL), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, 41% (n = 7) se tornaram não aderente, 35% (n = 6) se tornaram formadores de biofilme moderado e 24% (n = 4) continuaram sendo classificadas como formadoras de biofilme forte. E após 2 h de tratamento com DNase I (2 mg/mL), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, todas continuaram a serem classificadas como biofilme forte. Por fim, após 2 h de tratamento com metaperiodato de sódio (40 mM), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, uma (6%) não aderiu ao material, uma (6%) se tornou formadora de biofilme fraco, uma (6%) de biofilme moderado e 14 (82%) continuaram sendo classificadas como formadoras de biofilme forte (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Resultado do tratamento do biofilme de *A. baumannii* com proteinase K (1 mg/mL), DNase I (2 mg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM) por 2 h.

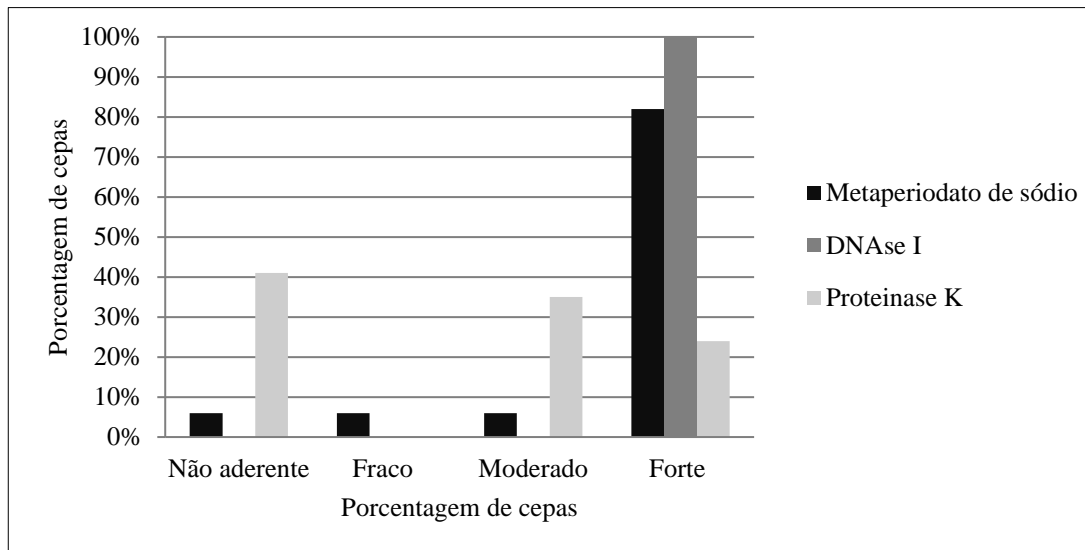
Biofilme	Proteinase K	DNase I	Metaperiodato de sódio
Forte (n = 17)	Não aderente (n = 7; 41%)	Biofilme Forte (n = 17; 100%)	Não aderente (n = 1; 6%)
	Biofilme moderado (n = 6; 35%)		Biofilme fraco (n = 1; 6%)
	Biofilme forte (n = 4; 24%)		Biofilme moderado (n = 1; 6%)
			Biofilme Forte (n = 14; 82%)

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Na **Figura 8** é possível observar que após o tratamento com metaperiodato de sódio (40 mM) e com DNase I (2 mg/mL) por 2 h a maior parte das cepas continuou sendo classificada como formadora de biofilme forte em comparação com o tratamento com proteinase K (1 mg/mL).

Após 24 h de tratamento com proteinase K (1 mg/mL), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, oito (47%) se tornaram não aderente, sete (41%) formadoras de biofilme fraco e duas (12%) de biofilme moderado. Já após 24 h de tratamento com DNase I (2 mg/ml), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, quatro (24%) se tornaram não aderente, quatro (24%) formadoras de biofilme fraco e nove (52%) de biofilme moderado. E após 24 h de tratamento com metaperiodato de sódio (40 mM), das 17 cepas formadoras de biofilme forte, duas (12%) se tornaram não aderentes ao material, cinco (29%) formadoras de biofilme fraco e quatro (24%) de biofilme moderado e 6 (35%) continuaram sendo classificadas como formadoras de biofilme forte (**Tabela 10**).

Figura 8 - Comparação da classificação do tipo de biofilme formado pelos das 17 cepas de *A. baumannii* após o tratamento do biofilme com metaperiodato de sódio (40 mM), DNase I (2 mg/mL) e proteinase K (1 mg/mL) por 2 h.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Tabela 10 - Resultado do tratamento do biofilme de *A. baumannii* com proteinase K (1 mg/mL), DNase I (2 mg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM) por 24 h.

Biofilme	Proteinase K	Dnase I	Metaperiodato de sódio
Forte (n = 17)	Não aderente (n = 8; 47%)	Não aderente (n = 4; 24%)	Não aderente (n = 2; 12%)
	Biofilme fraco (n = 7; 41%)	Biofilme fraco (n = 4; 24%)	Biofilme fraco (n = 5; 29%)
	Biofilme moderado (n = 2; 12%)	Biofilme moderado (n = 9; 52%)	Biofilme moderado (n = 4; 24%)
			Biofilme forte (n = 6; 35%)

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

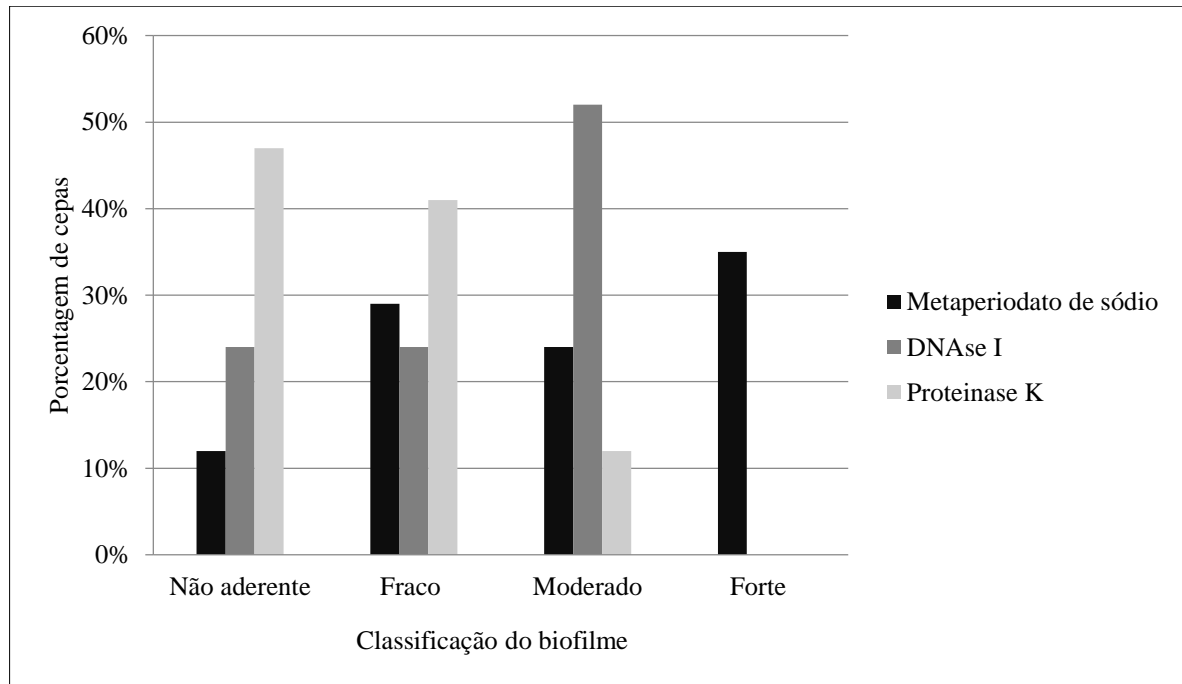
Na **Figura 9** é possível observar que após o tratamento com a proteinase K (1 mg/mL) por 24 h, a maior parte das cepas perderam a capacidade de aderir ao material, sendo classificadas como não aderentes ou como formadores de biofilme fraco em comparação com o tratamento com DNase I (2 mg/mL) e metaperiodato de sódio (40 mM).

4.10 Avaliação do efeito do etanol no biofilme de *A. baumannii*

Para a avaliação do efeito do etanol sobre o biofilme de *A. baumannii* foram selecionadas, além das cepas capazes de formar biofilme forte (n=17), seis cepas classificadas como formadoras de biofilme moderado e cinco cepas classificadas como formadoras de

biofilme fraco e 13 que foram anteriormente classificados como não aderentes, totalizando assim, 41 cepas.

Figura 9 - Comparação da classificação do tipo de biofilme formado pelas 17 cepas de *A. baumannii* após o tratamento do biofilme com metaperiodato de sódio (40 mM), DNase I (2 mg/mL) e proteinase K (1 mg/mL) por 24 h.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Após incubação por 1 h com etanol a 2%, das 13 cepas que não aderiram ao material, duas continuaram a ser classificadas como não aderentes, três se tornaram formadoras de biofilme fraco, uma de biofilme moderado e sete de biofilme forte. Já das cinco cepas formadoras de biofilme fraco, duas se tornaram formadoras de biofilme fraco e três de biofilme forte. Também foi possível observar que dentre as seis cepas formadoras de biofilme moderado todas se tornaram formadoras de biofilme forte. E por fim, das 17 cepas formadoras de biofilme forte, uma se tornou biofilme fraco, uma se tornou formadora de biofilme moderado e 15 continuaram sendo classificadas como formadoras de biofilme forte (**Tabela 11**).

Em comparação com as classificações de biofilme feitas antes do tratamento com etanol na concentração 2% ($n = 72$), foi possível observar que após esse tratamento, das 41 cepas selecionadas, aumentou o número de cepas formadoras de biofilme forte. Sem tratamento, das 41 cepas selecionadas, 32% ($n = 13$) não formavam biofilme, após o tratamento com etanol apenas 5% ($n = 2$) não aderiram ao material; sem tratamento, 12% ($n = 5$) foram classificadas como formadoras de biofilme fraco, após o tratamento com etanol, 15% ($n = 6$) formaram

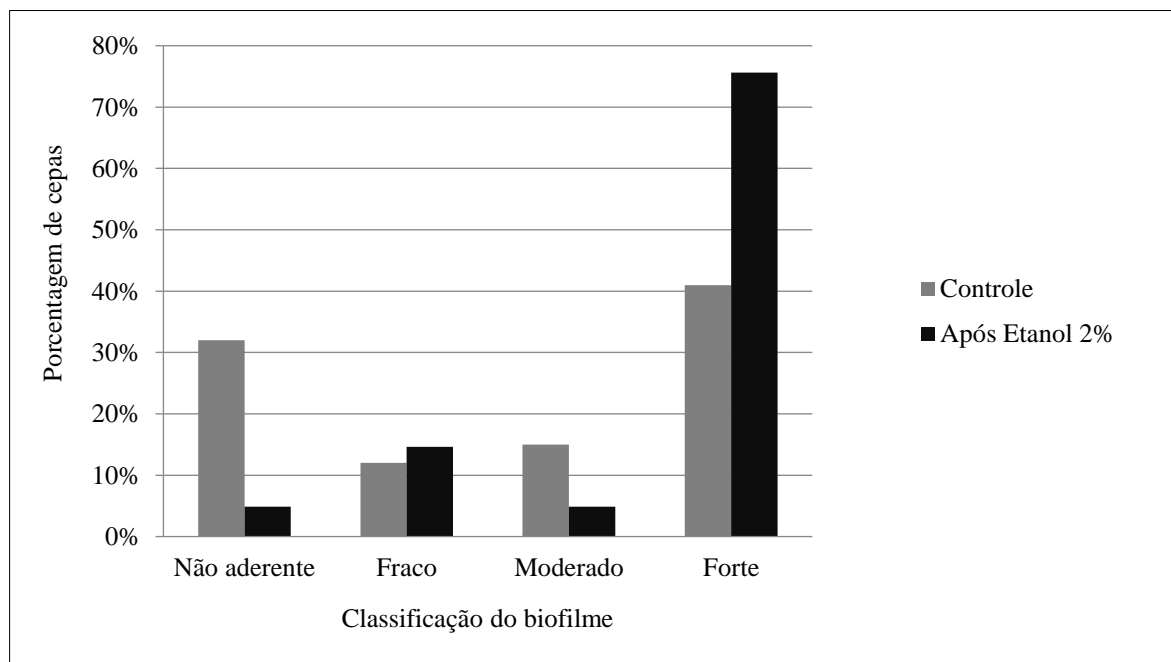
biofilme fraco; sem tratamento, 15% (n = 6) das cepas foram classificadas como formadoras de biofilme moderado, após o tratamento, 5% (n = 2) formaram biofilme moderado; e por fim, sem tratamento, 41% (n = 17) das cepas foram classificadas como formadoras de biofilme forte, após o tratamento com etanol, 76% (n = 31) tiveram essa classificação (**Figura 10**).

Tabela 11 - Efeito do etanol na concentração de 2% sobre o tipo de biofilme formado pelas cepas de *A. baumannii*.

Biofilme	Etanol 2%
Não aderente (n = 13)	Não aderente (n = 2; 15%) Biofilme fraco (n = 3; 23%) Biofilme moderado (n = 1; 8%) Biofilme forte (n = 7; 54%)
Fraco (n = 5)	Biofilme fraco (n = 2; 40%) Biofilme forte (n = 3; 60%)
Moderado (n = 6)	Biofilme forte (n = 6; 100%)
Forte (n = 17)	Biofilme fraco (n = 1; 6%) Moderado (n = 1; 6%) Biofilme forte (n = 15; 88%)

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Figura 10 - Classificação do biofilme das 41 cepas de *A. baumannii* selecionadas após serem submetidas ao tratamento com etanol 2% por 1 h.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: Controle, cepas não submetida ao tratamento.

4.11 Análise do biofilme por MVCL

A MVCL foi utilizada para visualizar as estruturas bi e tridimensional do biofilme de *A. baumannii*. Foram utilizadas cinco cepas, duas classificadas como formadoras de biofilme forte (23SAN e 69SAN), uma como biofilme moderado (120SAN), uma como biofilme fraco (136SAN) e uma última classificada como não aderente (131SAN). Além disso, a técnica foi utilizada para ver alterações na estrutura do biofilme de uma cepa de *A. baumannii* (69SAN), previamente classificada como biofilme forte, que foi submetida ao com tratamento com metaperiodato de sódio (40 mM), DNase I (2 mg/mL) ou proteinase K (1 mg/mL), por 2 h e 24 h. Por fim, visualizamos a ação do etanol 2% na estrutura de uma cepa de *A. baumannii* (71SAN) previamente classificada como não aderente e que após a adição dessa substância, foi classificada como biofilme forte.

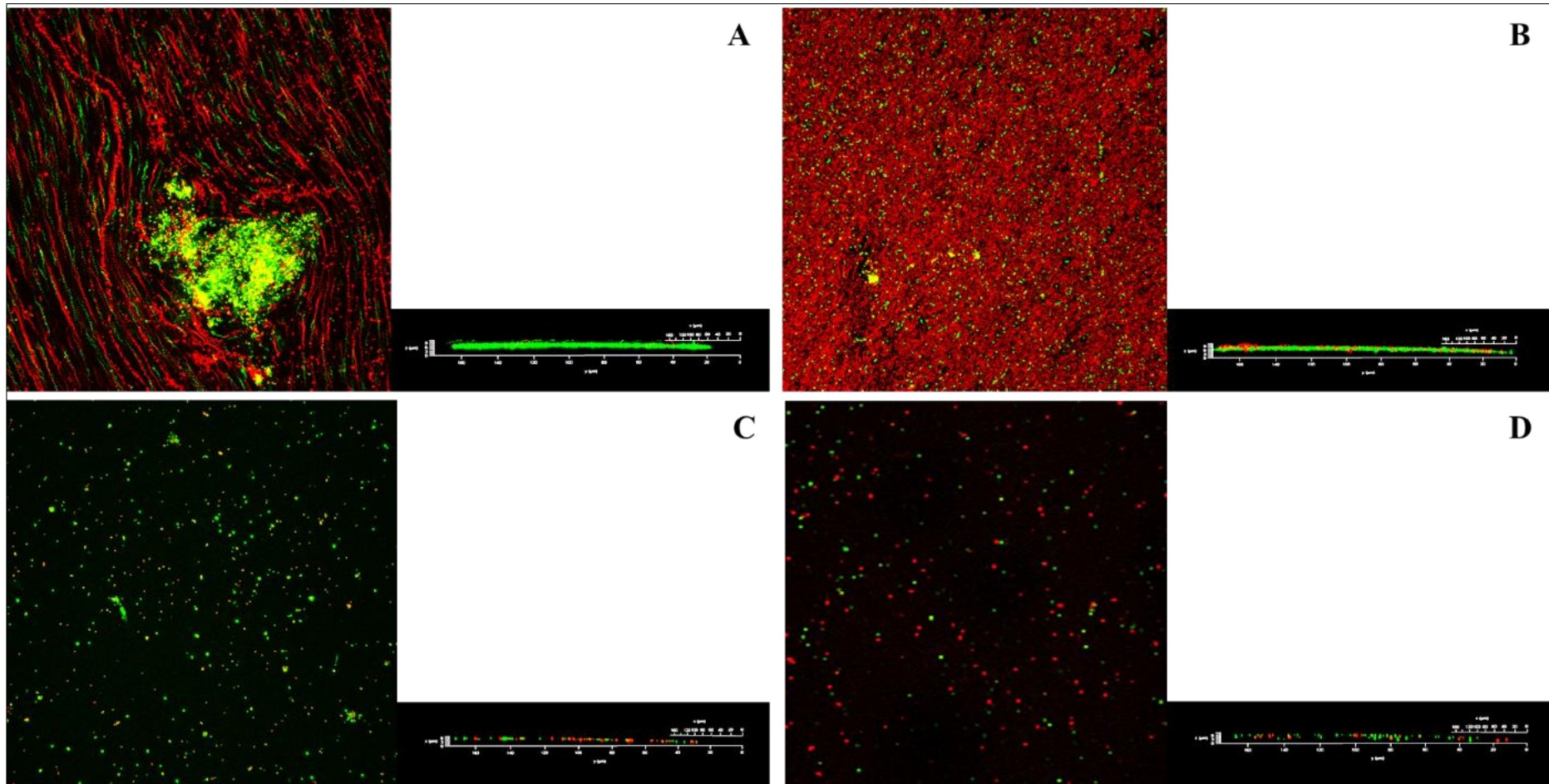
Após a análise das imagens obtidas na microscopia confocal, observamos que nas cepas classificadas como formadores de biofilme forte e moderado foi visualizada uma camada densa de células vivas e mortas. Não foi visualizada a formação do biofilme e apenas células espalhadas pelo campo nas cepas classificadas como formadores de biofilme fraco e naquele não aderente (**Figura 11**). Além disso, na imagem do biofilme das cepas classificadas como biofilme forte (23SAN e 69SAN) observamos a formação de canais que atravessavam o biofilme (**Figura 12**).

Para a análise visual do biofilme após o tratamento com metaperiodato de sódio, DNase I e proteinase K por 2 h e 24 h, selecionamos apenas uma cepa (69SAN) classificada como formadora de biofilme forte (**A, Figura 13**). Após 2 h e 24 h de tratamento com metaperiodato de sódio, foi observado que essa substância não foi capaz de promover grandes alterações no biofilme, em ambas imagens (**B e C, Figura 13**), sendo possível observar camadas densas de células. Entretanto, observamos uma diferença entre as imagens dos diferentes tempos de tratamento, no tratamento com o metaperiodato de sódio por 24 h havia um maior número de células mortas em comparação com a imagem do biofilme após o tratamento por 2 h. assim como anteriormente observado nas imagens do biofilme sem tratamento

Assim como o tratamento com o metaperiodato de sódio, o tratamento com a DNase I também não foi capaz de promover grandes alterações na estrutura do biofilme, tanto no tratamento por 2h, quanto no de 24h (**D e E, Figura 13**). Diferente dos tratamentos utilizados anteriormente, a proteinase K destruiu completamente o biofilme (**F e G, Figura 13**), já que após análise das imagens observamos apenas células dispersas pelo campo.

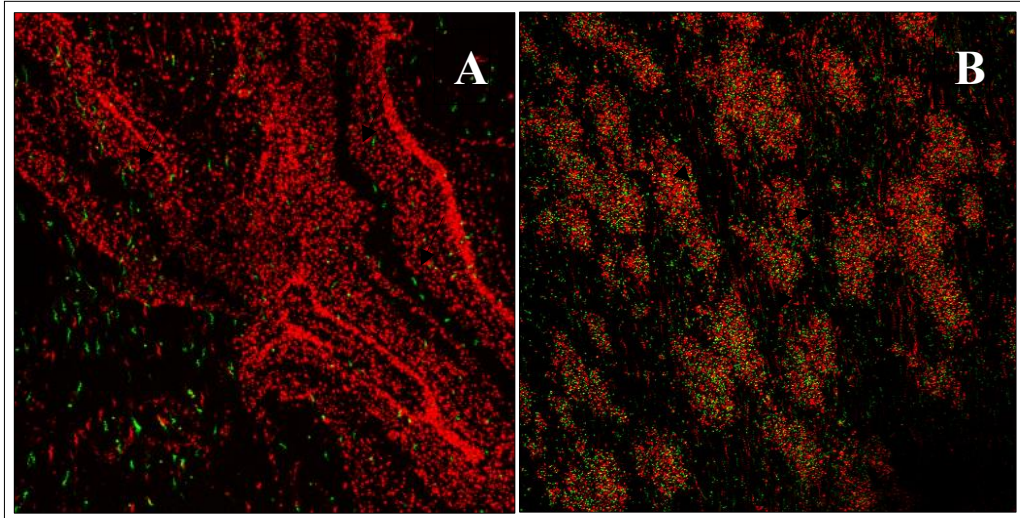
Para a análise visual do biofilme após a adição de etanol 2%, selecionamos uma cepa (171SAN) classificada como não aderente. Após 1 h da adição do etanol foi observado que após a adição dessa substância houve um aumento do biofilme dessa cepa, corroborando com nossos achados que previam esse aumento da formação de biofilme em algumas cepas após a adição de etanol 2% (**B, Figura 14**).

Figura 11 - Microscopia confocal das cepas de *A. baumannii* 23SAN (biofilme forte; A), 120SAN (biofilme moderado; B), 136SAN (biofilme fraco; C) e 131SAN (não aderente; D) sem tratamento, em aumento de 20x.



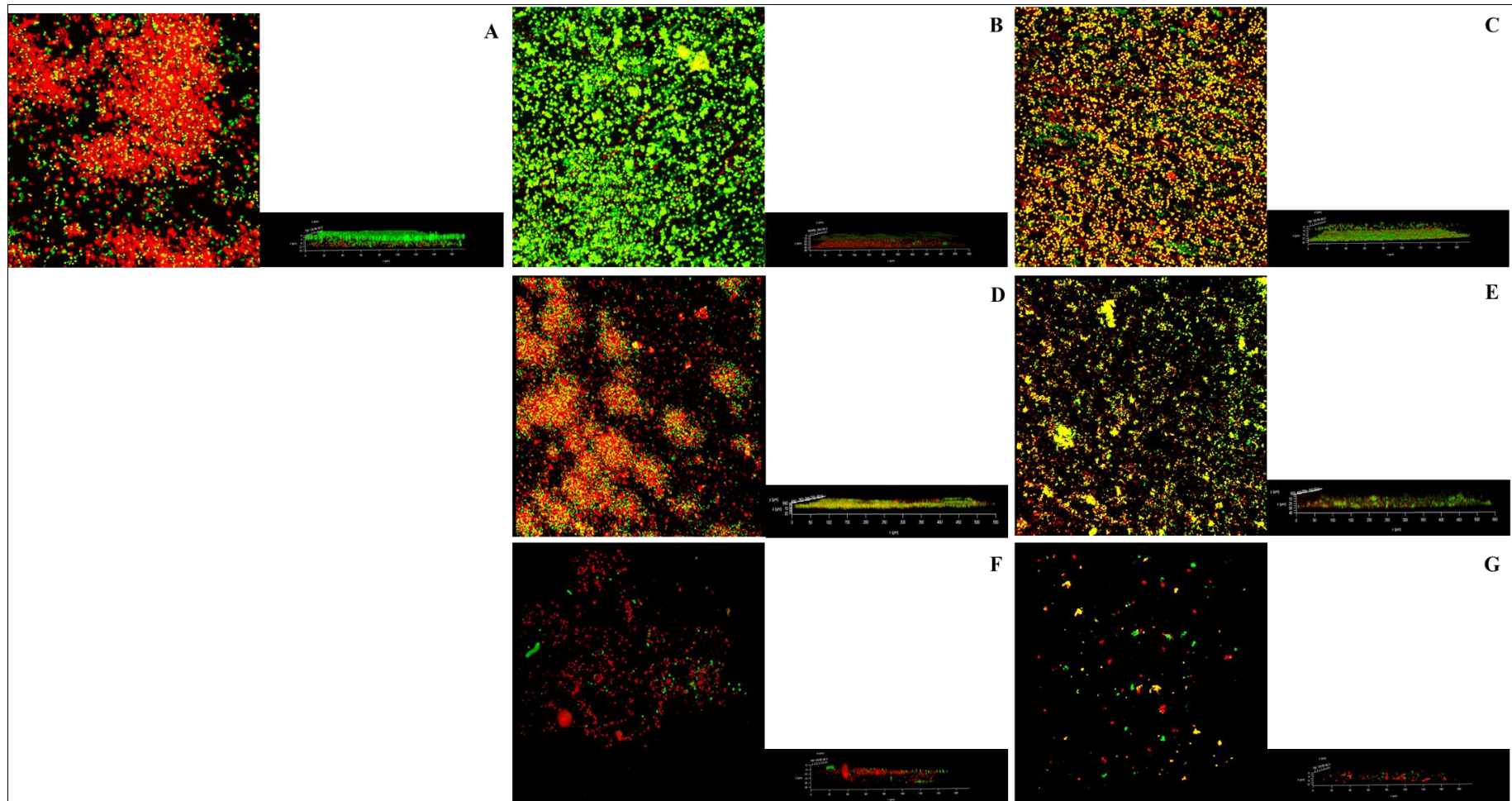
Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Figura 12 - Microscopia confocal das cepas de *A. baumannii* 23SAN (A, aumento 63x) e 69SAN (B, aumento 20x) (biofilme forte). As setas indicam a formação de canais visualizados na microscopia.



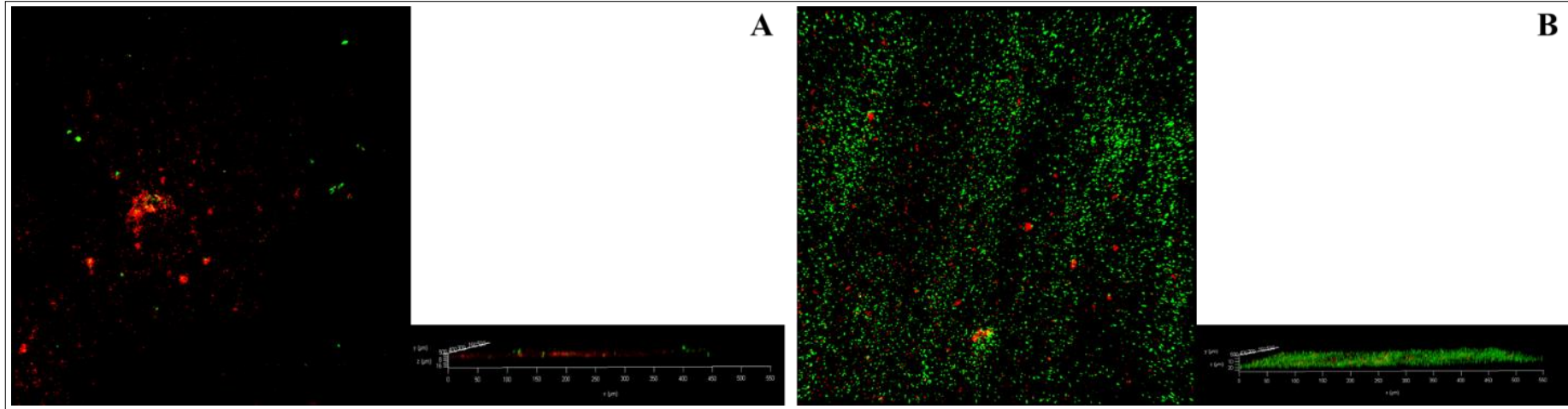
Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Figura 13 - Microscopia confocal da cepa de *A. baumannii* 69SAN sem tratamento (A) e após tratamento com metaperiodato de sódio por 2 h (B), metaperiodato de sódio por 24 h (C), DNase I por 2 h (D), DNase I por 24 h (E), proteinase K por 2 h (F), proteinase K por 24 h (G), em aumento de 20x.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Figura 14 - Microscopia confocal da cepa de *A. baumannii* 71SAN sem tratamento (A) e após adição de etanol 2% por 1 h em aumento de 20x.



Fonte: (GENTELUCI, 2020).

5 DISCUSSÃO

Há alguns anos, *A. baumannii* foi identificado como um dos seis patógenos resistentes responsáveis pela mortalidade e morbidade em pacientes (RICE et al., 2008). Esse micro-organismo causa diversas infecções hospitalares como, pneumonia, infecções do trato urinário, endocardite, sepse, meningite, infecções de pele e tecidos moles e feridas (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014). Além disso, possui uma plasticidade genética que permite que se adapte ao ambiente e sobreviva à pressão seletiva presente no ambiente hospitalar, contribuindo para a aquisição de múltiplos mecanismos de resistência (LIN; LAN, 2014).

Em nosso estudo investigamos a diversidade genética, resistência a antimicrobianos, presença de heterorresistência e resistência adaptativa à polimixina B, e formação de biofilme de cepas de *A. baumannii* coletadas de dois hospitais públicos do município do Rio de Janeiro, por um período de um ano.

Setenta e quatro isolados de *Acinetobacter* foram previamente identificados por testes fenotípicos por meio do sistema automatizado Vitek 2 como pertencentes ao complexo Acb. A confirmação da identificação desses isolados foi realizada por meio de testes bioquímicos convencionais e métodos moleculares. Na identificação molecular, foi confirmada a identificação de 72 cepas como *A. baumannii*.

A identificação molecular a nível de espécie foi realizada por meio da amplificação por PCR e sequenciamento do gene *rpoB* (LA SCOLA et al., 2004). O gene *rpoB* possui aproximadamente 4.000 bp e apenas uma cópia no genoma de *Acinetobacter* sp. Além disso, possui quatro regiões variáveis, delimitadas por sequências conservadas (LA SCOLA et al., 2006). A precisão da identificação de *Acinetobacter* a nível de espécie pelo sequenciamento do *rpoB* é de 98,2% (LEE et al., 2014).

Estudos que investigaram a eficácia do sequenciamento do gene *rpoB* para a diferenciação das espécies de *Acinetobacter*, demonstraram que embora a similaridade interespecie esteja bem separada (variando de 88,3 a 96,9%), a similaridade intraespécie das sequências gênicas de *rpoB* varia de 98% a 100% para *A. baumannii*, por exemplo (LA SCOLA et al., 2006, GUNDI et al., 2012). Isso demonstra que o sequenciamento desse gene é um dos mais apropriados para a discriminação a nível de espécie por conta de ser altamente variável, comparado com outros métodos baseados em análise de sequências de DNA também utilizados, como o gene 16S rRNA (WANG et al., 2014).

As 72 cepas de *A. baumannii* foram coletados de seis espécimes clínicos (aspirado traqueal, urina, sangue, ferida, *swab* retal, lavado broncoalveolar, cateter e aspirado brônquico).

Em nosso estudo, o principal sítio de isolamento de *A. baumannii* foi o sistema respiratório (aspirado traqueal, lavado broncoalveolar e aspirado brônquico). Resultados obtidos em estudos anteriores no Brasil e em outros países também relataram as maiores taxas de isolamento desse micro-organismo nesse sítio de coleta (HUANG et al., 2013, DEXTER et al. 2015, NOWAK et al., 2017, DE AZEVEDO et al. 2019, POLOTTO et al., 2020).

A. baumannii é o principal micro-organismo relacionado a pneumonia associada ao uso de ventilador mecânico, responsável por quase 15% de todas as IRAS e por aproximadamente 50% do uso total de antimicrobianos nas UTI (DEMIRDAL; SARI; NEMLI, 2016). Altas taxas de mortalidade foram relatadas para pneumonia hospitalar causada por *A. baumannii* (variando de 28,1 a 85,3%) (DEMIRDAL; SARI; NEMLI, 2016).

A análise genotípica realizada por meio da técnica de PFGE mostrou a presença de 15 pulsotipos entre as 72 cepas, utilizando a similaridade > 85%. Os pulsotipos mais predominantes foram A e B, que agruparam 19 e 12 cepas, respectivamente, o que sugere alta disseminação clonal (DUARTE et al., 2016).

Por meio do MLST, identificamos entre as cepas estudadas, sete ST, agrupados em quatro CC (103, 231, 235 e 229), de acordo com o esquema Oxford e oito de acordo com o esquema Pasteur, agrupados em cinco CC (1, 10, 15, 162 e 213) diferentes associados com cepas clínicas de *A. baumannii* MDR.

De acordo com o esquema Oxford, o CC103 englobou duas cepas, uma pertencente ao ST133 e a outra ao ST438. O ST133 foi descrito pela primeira vez em cepas clínicas de *A. baumannii*, produtoras de OXA-23 coletadas no Rio de Janeiro, Brasil (GROSSO et al., 2011). Além disso, como observado no presente estudo, o CC103 está relacionado com o CC15 (Pasteur) (TOMASCHEK et al., 2016). Esses dois CC correspondem ao CI4 descrito por Diancourt et al. (2010).

O CC229 que englobou um ST (ST229) já foi descrito em um estudo que analisou cepas clínicas e ambientais de *A. baumannii*. Nesse estudo, o ST englobado nesse CC foi o ST1399 que foi relacionado com a formação de biofilme nessas cepas (ROYER et al., 2018). Esse CC também está relacionado com o CI3 (DIANCOURT et al., 2010).

O CC231 englobou dois ST (ST231 e 2097) e está relacionado com o CC1, de acordo com o esquema Pasteur, e conseqüentemente ao CI1 (GAIARSA et al., 2019). Cepas clínicas de *A. baumannii* resistente aos carbapenemas e pertencentes ao ST231 já foram descritas anteriormente na América do Sul e do Norte, e também na Europa (GRANA-MIRAGLIA et al., 2016). Além disso, o ST231 possui uma grande importância epidemiológica devido ao relato da presença do gene *bla*OXA-23 (GAIARSA et al., 2019).

O ST235 pertencente ao CC235, já foi descrito em cepas de *A. baumannii* brasileiras coletadas de pacientes diagnosticados com meningite (CHAGAS et al., 2013).

Por fim, o ST305 que foi considerado um *singleton*, no *website* do instituto não possui inclusões de cepas (PUBMLST, 2020). Além disso, não existem relatos na literatura sobre esse ST.

De acordo com o esquema Pasteur, encontramos três cepas englobadas no CC1 (CI1), que pertenciam aos ST986, 1439 e 160, respectivamente. Esse CC estava presente nos dois hospitais estudados e já foi descrito em cepas coletadas no Brasil (CHAGAS et al., 2014). O CC1 é designado como um dos maiores clones de *A. baumannii* com uma ampla distribuição internacional (KARAH et al., 2012).

Observou-se também a ocorrência do CC15, onde foram englobadas duas cepas uma pertencente ao ST15 e outra ao ST330. Além de ser um clone emergente na Europa, Ásia, África e EUA (NOWAK et al., 2017), esse CC também está disseminado no Brasil e já foi descrito em nove estados brasileiros, em quatro diferentes regiões geográficas do país (GROSSO et al., 2011, MARTINS et al., 2013, CHAGAS et al., 2014, VASCONCELOS et al., 2017).

Segundo Diancourt et al. (2010), cepas de *A. baumannii* pertencentes ao ST15 apresentam um sucesso evolutivo e mundialmente exibem fenótipos MDR, o que facilita sua rápida disseminação. O CC15 também é relacionado com grande resistência aos antimicrobianos e a capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas (KARAH et al., 2015).

O ST188 é descrito em trabalhos anteriores como um *singleton*, indicando que não possui um número suficiente de inclusões para formar um complexo clonal (RAFEI et al., 2014), porém no presente estudo esse ST foi englobado no CC10. O CC10 está englobado no CI3 junto a outros CC que foram isolados em diferentes países europeus (ZARRILLI et al., 2013)

Já o ST162 (CC162) foi descrito inicialmente na Coreia do Sul (LEE et al., 2012) e em seguida foi detectado no Brasil (COELHO-SOUZA et al., 2013, CHAGAS et al., 2014). Um estudo demonstrou que as infecções por cepas de *A. baumannii* pertencentes ao ST162 levam a uma menor gravidade quando comparadas a infecções por cepas de outros ST. Isso sugere que os ST de *A. baumannii* podem ser relacionados com uma maior ou menor virulência das cepas (DE AZEVEDO et al., 2019).

Por fim, o ST103 (CC213) está disseminado na América do Sul e tem sido relacionado com a presença de *bla*_{OXA-23} (CLÍMACO et al., 2013, VASCONCELOS et al., 2015). Outros CC também estão associados a presença desse gene, como, CC113, 109 e 110, isso indica que

*bla*_{OXA-23-like} não está restrito a um CC principal (CLÍMACO et al., 2013). Além disso, é um ST considerado raro, pois apenas três cepas (EUA, Egito e Brasil) foram encontradas na base de dados de *A. baumannii* (PubMLST Pasteur) (HAMIDIAN et al., 2017).

Adicionalmente, foram determinados dois novos ST, um pelo esquema Oxford (ST2097), que foi agrupado no CC231, ao qual já pertencia um ST descrito no presente estudo, e um pelo esquema Pasteur (ST1439), que foi agrupado no CC1, ao qual já pertenciam dois ST descritos no presente estudo.

Os resultados do MLST mostraram pouca correlação com os resultados do PFGE, pois apesar das cepas que pertenciam ao pulsotipo B serem agrupadas nos mesmos ST (ST 305, esquema Oxford e ST 188, esquema Pasteur), as cepas pertencentes ao pulsotipo A foram agrupadas em ST distintos pelos dois esquemas (ST133 e 438, esquema Oxford e ST15 e 330, esquema Pasteur). Porém é importante ressaltar, que mesmo essas cepas agrupadas em ST distintos, elas pertenceram ao mesmo CC (CC103 e CC15, Oxford e Pasteur, respectivamente).

Por outro lado, as cepas pertencentes aos pulsotipos C e B foram agrupadas no mesmo ST (ST231) pelo esquema Oxford. Estudos revelaram que o MLST utilizando o esquema Oxford é menos discriminativo que o PFGE (TOMASCHEK et al., 2016)

Apesar de poucas cepas terem sido analisadas por meio da técnica de MLST no presente estudo, através dessa análise, podemos observar que dentro de um mesmo perfil de PFGE podem existir diferentes ST. Isso poderia ser parcialmente justificado pelas diferenças metodológicas das duas técnicas, ou seja, diferente do PFGE, o MLST avalia a sequência nucleotídica do DNA bacteriano. Por conta disso, o MLST pode possuir maior capacidade de discriminação entre as cepas.

O MLST permitiu a comparação dos nossos resultados com o cenário nacional e mundial quanto à distribuição, predominância e ST circulantes em cepas clínicas coletadas na cidade do Rio de Janeiro. Isto pode ser evidenciado com a descrição de um novo ST, bem como ST iguais circulando em dois hospitais distintos.

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos revelou altos níveis de resistência das cepas de *A. baumannii* estudadas à maioria dos antimicrobianos testados. Essas cepas apresentaram resistência maior que 80% à maioria das classes testadas, incluindo, penicilinas (ampicilina e sulbactam e piperacilina e tazobactam), cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) e inibidores da via do folato (trimetopim-sulfametoxazol). Esses dados são semelhantes aos observadas em outras coleções brasileiras de cepas de *A. baumannii* (DIAS et al., 2017, ROMANIN et al., 2019).

Além disso, observamos resistência maior que 95% aos carbapenemas (imipinem e meropenem), essas altas taxas de resistência foram relatadas em todo o mundo, inclusive em cepas coletadas no Brasil (MUGNIER et al., 2010, DA SILVA et al., 2016, GENTELUCI et al. 2016, DIAS, 2017, BRASILIENSE et al. 2019). Essa classe de antimicrobianos é geralmente de escolha no tratamento das infecções causadas por micro-organismos MDR. Porém, nos últimos vinte anos, a resistência aos carbapenemas está aumentando, tornando praticamente o tratamento ineficaz, isso demonstra a necessidade de encontrar novas alternativas terapêuticas (ADAMS-HADUCH et al., 2008, DOI et al. 2016, TAL-JASPER et al., 2016).

Em contrapartida, aproximadamente 50% das cepas estudadas eram susceptíveis aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), essa classe e a classe das tetraciclinas (minociclina) foram as que apresentaram maior eficácia dentre as cepas estudadas. Vale a pena ressaltar que nenhuma cepa apresentou resistência a minociclina.

Os aminoglicosídeos são uma opção potencial de tratamento para infecções por *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas, no entanto, várias cepas são capazes de produzir AME, o mais importante mecanismo de resistência a aminoglicosídeos em *A. baumannii* (VIEHMAN; NGUYEN; DOI, 2014).

As informações sobre a resistência aos aminoglicosídeos e a prevalência de cepas produtora de EMA no Brasil são escassas e poucos estudos foram realizados para investigar essas enzimas nessa espécie (POLLOTO et al., 2020). Já foram descritas taxas de aproximadamente 20% de resistência a esses antimicrobianos em amostras de *Acinetobacter* sp. coletadas em todo o mundo (GALES et al., 2019). No Brasil, foram observadas taxas de resistência aos aminoglicosídeos similares às observadas no presente estudo (MACHADO et al., 2011, ROCHA et al., 2017)

A eficácia da minociclina como tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR e XDR já está sendo discutida, com cepas apresentando taxas de suscetibilidade de 80 a 90% (VALENTINE et al., 2008, AKERS et al., 2009, GALES et al., 2019). Um estudo que avaliou o tratamento de 223 pacientes com infecções nosocomiais por *A. baumannii* com esse antimicrobiano, relatou que os pacientes que receberam a minociclina com uma combinação de outros antimicrobianos, como carbapenemas, apresentaram uma taxa de sucesso clínico de 70,5%, em contrapartida, os pacientes que receberam apenas a minociclina apresentaram uma taxa de sucesso clínico de 88,9% (FRAGKOU et al., 2019).

Nesse sentido, a minociclina tem sido utilizada com sucesso no tratamento de infecções de feridas e pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* MDR. Isso

sugere que esse derivado mais recente da tetraciclina pode ter um papel adicional na futura terapêutica do *Acinetobacter* MDR (CHU et al., 2013, GREIG et al., 2016).

Além da minociclina, outros antimicrobianos como as polimixinas também tornaram-se alternativas para o tratamento de infecções causadas por esse micro-organismo, as polimixinas e como esperado, relatos de resistência às polimixinas começaram a aparecer com crescente frequência (DOI et al. 2016, CASTILHO et al., 2017).

Neste estudo, a minoria das cepas foi resistente à polimixina B (19%), esses resultados estão de acordo com estudos anteriores, que apresentam taxas de resistência próximas a 10% (VASCONCELOS et al., 2015, CASTILHO et al., 2017). Porém, apesar da baixa prevalência de resistência à polimixina, fenótipos relacionados à resistência à polimixina são preocupantes, pois podem prejudicar a terapia antimicrobiana (GALES; JONES; SADER, 2011).

Outros estudos que analisaram a resistência a esse antimicrobiano encontraram taxas de resistência maiores que as relatadas no presente estudo. Martins et al. (2014), ao avaliarem o perfil de resistência de *A. baumannii* a antimicrobianos em cinco hospitais de Belo Horizonte, foram identificadas 39% de cepas resistentes à polimixina B.

Em nosso estudo, de acordo com Magiorakos et al. (2012), classificamos 62% das cepas de *A. baumannii* como MDR, resistentes a pelo menos um antimicrobiano pertencente a três classes e 35% como XDR, resistentes a pelo menos um antimicrobiano pertencente a todas as classes. Esses achados estão em acordo com outros estudos com cepas de *A. baumannii* coletadas em todo o mundo que relataram a prevalência desse micro-organismo MDR na faixa de 60 a 100% (OBEIDAT et al., 2014, AZIZI et al., 2016, GREENE et al., 2016).

A classificação de resistência das cepas neste estudo revelou altas taxas do fenótipo XDR. Estudos anteriores descreveram taxas semelhantes ou até maiores que as reveladas no presente estudo. É observado um aumento global no isolamento de cepas de *A. baumannii* MDR e XDR em ambientes hospitalares (KHAN et a., 2017, KOLPA et al., 2018).

Em todo o mundo, os perfis de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas de *A. baumannii* foram semelhantes, o que causa grande preocupação, considerando a falta de opções de tratamento para lidar com infecções por *A. baumannii* MDR (DOI et al., 2016). O avanço da resistência antimicrobiana em *A. baumannii* XDR é relativo a um futuro de infecções intratáveis e os programas de administração são cruciais para gerenciar e conservar essas últimas opções de tratamento. Nossos resultados demonstram a relevância deste estudo e a necessidade de monitorar a disseminação desses patógenos no ambiente hospitalar.

Atualmente, há uma escassez de estudos avaliando a heterorresistência à polimixina. Esses estudos são limitados pelo tamanho da amostra, diferentes métodos de detecção de

heterorresistência e grande variabilidade da heterorresistência de polimixina (LI et al., 2006, YAU et al., 2009, RODRIGUEZ et al., 2009).

A heterorresistência de *A. baumannii* à polimixina E (colistina) foi descrita inicialmente por Li et al. (2006), onde os pesquisadores avaliaram 16 cepas clínicas de *A. baumannii* susceptíveis à colistina com MIC variando de 0,25 a 2 mg/L. A heterorresistência foi demonstrada em 15 das 16 cepas. Outro estudo que avaliou 19 cepas clínicas de *A. baumannii* MDR com suscetibilidade previamente determinada à colistina ($CIM \leq 1$ mg/L), relatou sete cepas heterorresistentes que haviam sido coletadas de pacientes que haviam recebido antibioticoterapia com colistina (HAWLEY; MURRAY; JORGENSEN, 2008).

Ema alta heterorresistência à polimixina E foi demonstrada em estudos realizados em outros países como EUA, em 20 (83%) das 24 cepas de origem sanguínea e respiratória coletadas (SRINIVAS et al., 2018). No entanto, no Brasil, um estudo que investigou a presença de heterorresistência à polimixina B em 22 cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas não relatou a presença desse fenômeno (BARIN et al., 2013).

Outro estudo relatou uma taxa de 21% de heterorresistência a esse mesmo antimicrobiano, entre cepas coletadas na Europa (ÇAĞLAN et al., 2019). Yau et al. (2009) relataram 23% de heterorresistência em 30 cepas coletadas entre os anos de 1998 e 2006 em Países do Oeste do Pacífico. Por fim, Gazel, Tatman Otkun e Akçali (2017) investigaram a heterorresistência em cepas de *A. baumannii* coletadas de sangue na Turquia e não foi observada nenhuma cepa heterorresistente.

No presente estudo, a presença de heterorresistência à polimixina B foi demonstrada em 21 das 58 cepas testadas. É importante ressaltar que o uso prévio de polimixina B não foi associado ao desenvolvimento subsequente de heterorresistência.

A presença da resistência adaptativa também foi pesquisada e diferente dos resultados encontrados em nosso estudo, Barin et al. (2013) relataram a presença de resistência adaptativa em 55% das cepas estudadas.

Em nosso estudo, todas as cepas classificadas como heterorresistentes à polimixina B foram classificadas como MDR ou XDR. Além disso, a maioria das cepas de *A. baumannii* de origem respiratórias demonstrou heterorresistência à polimixina B. Srinivas et al. (2018) já relataram essa prevalência de cepas heterorresistentes de origem respiratória.

A presença de heterorresistência foi encontrada em 11 dos 15 pulsotipos descritos no estudo, entretanto, é importante notar que nenhuma das cepas pertencentes ao pulsotipo B, considerado um dos pulsotipos predominante nesse estudo, apresentou heterorresistência à polimixina B.

Clinicamente, a heterorresistência causa grande preocupação, pois a proporção heterorresistente da população bacteriana pode ser selecionada e se tornar predominante durante a terapia, levando à falha do tratamento (KIM et al., 2014).

Os mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenemas nos bacilos Gram-negativos são diversos e incluem produção de carbapenemases, diminuição da permeabilidade devido à perda de porina, superexpressão da bomba de efluxo e alterações nas proteínas de ligação à penicilina (BUTLER et al., 2019). Porém o mais frequente em *Acinetobacter* sp. é a produção de carbapenemases mediada pela produção de enzimas classe D (LEE et al., 2017). As carbapenemases da classe D são compostas por vários genes *bla_{OXA}* que estão divididos em subgrupos, como *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-143}* (ROBLEDO et al., 2010, AZIMI et al., 2015).

No presente estudo, a carbapenemase do tipo OXA-23 foi considerada a mais comum, detectada em todas as cepas estudadas. Estudos revelaram que o aumento da resistência aos carbapenemas em cepas clínicas de *A. baumannii* está principalmente associado à disseminação das cepas produtoras de OXA-23 (ADAMS-HADUCH et al., 2008, MUGNIER et al., 2010, OPAZO et al. 2012, DA SILVA; DOMINGUES, 2016, NEVES et al., 2016).

A enzima OXA-23 é a carbapenemase mais disseminada globalmente, sendo altamente prevalente em *A. baumannii* resistente aos carbapenemas (OPAZO et al., 2012, LEE et al., 2017). O gene *bla_{OXA-23}* é considerado um biomarcador de virulência e uma causa significativa de resistência aos carbapenemas em todo o mundo. Esse gene pode estar localizado no cromossomo ou nos plasmídeos, a localização do *bla_{OXA-23}* em plasmídeos pode justificar parcialmente seu alcance global (LUO et al., 2015).

O surgimento e disseminação da OXA-23 foi relatado no Brasil e em outros países e representam um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenemas entre as cepas clínicas de *A. baumannii* (CORREA et al., 2012, LIAKOPOULOS et al., 2012, MANAGEIRO et al., 2012, OPAZO et al., 2012, CHAGAS et al., 2014, GENTELUCI et al., 2016). A presença desse gene foi relatada em até 100% das cepas brasileiras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas (MARTINS et al., 2013). Além disso, como foi observado em nosso estudo, é relatada a presença desse gene inclusive em cepas susceptíveis aos carbapenemas (CARVALHO et al., 2011, GENTELUCI et al., 2020).

Nossos resultados mostram que houve uma forte correlação entre a presença de *bla_{OXA-23-like}* e *ISAb1*, duas das três cepas que não possuíam essa associação foram susceptíveis aos carbapenemas. A presença de SI específicas, como *ISAb1*, localizadas adjacentes aos genes *bla_{OXA}*, leva a um aumento de sua expressão, resultando em uma diminuição adicional na

suscetibilidade aos carbapenemas (TURTON et al., 2006, RUIZ et al., 2007, VIANA et al., 2016).

Assim como em outros estudos, o gene *bla*_{OXA-24} também foi detectado, mas em apenas uma cepa (OPAZO et al., 2012, BRASILIENSE et al., 2019). Um estudo que analisou cepas de quatro estados brasileiros (n = 92), encontrou 12 cepas produtoras de *bla*_{OXA-24} oriundas de três estados (Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo) (ROCHA et al., 2017). Isso sugere o começo de uma disseminação desse gene no Brasil. Ainda existem poucos relatos do tipo OXA-24 no Brasil, mas todos estão associados a cepas de *A. baumannii* MDR (DE SA CAVALCANTI et al., 2013), diferente do nosso estudo que descreve a presença desse gene em uma cepa n-MDR.

Dentre as oxacilinases do tipo *bla*_{OXA-24}, a enzima OXA-72 foi identificada pela primeira vez em *A. baumannii* na Tailândia em 2004, em seguida, essa enzima foi relatada em cepas de *Acinetobacter* sp. coletadas em todo mundo (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Ao contrário da OXA-23, as cepas produtoras de OXA-72 foram relatadas em apenas alguns países como Brasil, Colômbia, Taiwan e França (SAAVEDRA et al., 2014, LU et al., 2009, BARNAUD et al., 2010, VASCONCELOS et al., 2015). No Brasil ainda existem poucos relatos de *A. baumannii* portando o OXA-72 (VASCONCELOS et al., 2015, GOMES et al., 2016, ROCHA et al., 2017).

No presente estudo não foi detectado o gene *mcr-1* em nenhuma cepa estudada. Outros estudos com cepas coletadas no Brasil também não detectaram a presença do *mcr-1* entre as cepas estudadas (LORENZONIA et al., 2018, ROMANIN et al., 2019). A ausência de genes *mcr-1* mediados por plasmídeo sugerem que a resistência à polimixina B nas cepas resistentes pode ser devido a presença de outros genes *mcr* (*mcr-2-9*) (STEFANIUK; TYSKI, 2019), além de outros mecanismos como os associados à alterações na membrana externa (mutações nos genes *pmr*, *lpx*, *lpsB*, *lptD*, *vacJ*) ou não associados a alterações na membrana externa (aumento da sensibilidade osmótica das células e bombas de efluxo) (LIMA et al., 2018).

Os fatores de virulência de *A. baumannii* ainda não foram completamente compreendidos e parece haver uma interação complexa entre diferentes determinantes de virulência e resistência antimicrobiana. Dentre esses determinantes, a formação de biofilme é um importante fator de virulência responsável pela persistência dos micro-organismos em várias superfícies (ARANDA et al., 2011, ESPINAL; MARTI; VILA, 2012).

No presente estudo, quase todas as cepas foram capazes de formar biofilmes (82%), mas com intensidades diversas, sendo a classificação de biofilme moderado a mais predominante entre as cepas estudadas. A formação de biofilme nas cepas estudadas foi maior do que em

alguns trabalhos, que demonstraram essa capacidade em aproximadamente 60% das cepas (RAO et al., 2008, RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2008, BADA VE; KULKARNI, 2015).

Estudos relataram que o tempo de sobrevivência das cepas formadoras de biofilme era muito maior em comparação com as que não formavam biofilmes (GUNN; BAKALETZ; WOZNIAK, 2016). Isso mostra que as cepas de *Acinetobacter* podem se fixar em superfícies abióticas e persistir em condições secas por período prolongado de tempo no ambiente hospitalar (ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012), contribuindo para a possibilidade de endemicidade e transmissão contínua sustentada a partir de prováveis fontes que poderiam ser infectantes para os pacientes (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018)

Atualmente, a relação da capacidade de formação de biofilme e a resistência antimicrobiana é discutida por diversos autores. Alguns estudos com *A. baumannii* afirmaram que há uma relação positiva entre esses dois eventos, indicando que os fenótipos MDR ou XDR estejam diretamente relacionados à maior formação de biofilme forte (REITER et al., 2011, GURUNG et al., 2013). Já outros estudos concluíram que existe uma possível relação inversa entre resistência e a formação de biofilme; isto é, a formação está diretamente relacionada ao fenótipo n-MDR (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2015, QI et al., 2016)

Neste estudo, não foi observada relação significativa entre a formação de biofilme e os fenótipos de resistência (n-MDR, MDR ou XDR), o que pode ter ocorrido por conta do grande número de cepas que apresentaram fenótipo MDR ou XDR. A não relação dessas características pode indicar a presença de eventos multifatoriais ou que a formação de biofilme é uma característica intrínseca das cepas estudadas (DUARTE et al., 2016, DOMENICO, 2017).

Também não foi possível verificar correlação entre formação de biofilme e os pulsotipos encontrados no estudo. Foi observada a presença de pulsotipos prevalentes (A e B) tanto entre as cepas formadoras de biofilme forte quanto as cepas não aderentes. Outros estudos também relatam essa não correlação entre a formação de biofilme e os genótipos de cepas de *A. baumannii* (DUARTE et al., 2016, GENTELUCI et al., 2020)

A partir dos resultados obtidos no estudo da natureza química do biofilme podemos sugerir a presença de proteínas na composição do biofilme das cepas estudadas de *A. baumannii*, já que a proteinase K foi capaz de destruir a maioria (41%, no tratamento por 2 h e 47% no tratamento por 24 h) dos biofilmes formados por cepas previamente classificadas como formadoras de biofilme forte.

Várias proteínas de superfície estão envolvidas no processo e parecem contribuir de maneira diferente para a ligação das células às superfícies bióticas ou abióticas. A principal proteína da membrana externa OmpA é essencial para o desenvolvimento de biofilmes em

plástico e também desempenha um papel importante na ligação de *A. baumannii* às células epiteliais alveolares humanas (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009). Outra proteína envolvida na adesividade celular e a formação de biofilme em muitas cepas de *A. baumannii* é a PER-1 (LEE et al., 2008). Como em outros patógenos, uma grande proteína expressa na superfície celular de *A. baumannii*, conhecida como Bap, tem um papel na formação do biofilme e na aderência da célula hospedeira (GOH et al., 2013).

O DNA extracelular (eDNA) é considerado um componente que está envolvido no processo de formação de biofilme, como demonstrado anteriormente em várias bactérias (QIN et al., 2007, THOMAS et al., 2009). Em *A. baumannii*, poucos artigos relataram a presença desse componente no biofilme desse micro-organismo. Estudos demonstraram a importância do eDNA, por meio de ensaios de aumento de biofilme, já que o eDNA pode ser absorvido eficientemente para a construção da matriz do biofilme e pode ajudar durante a agregação bacteriana e a estabilização de biofilmes (TETZ; TETZ, 2010, SAHU et al., 2012)

Apesar desses relatos, o tratamento com DNase I não causou alterações no biofilme das cepas selecionadas, sugerindo pouca ou nenhuma participação de DNA extracelular na composição do biofilme de *A. baumannii*, já que todas as cepas continuaram a serem classificadas como formadoras de biofilme forte e moderado após o tratamento por 2h e 24h.

Por fim, também não verificamos a presença de carboidratos no biofilme das cepas de *A. baumannii*. O tratamento com metaperiodato de sódio não causou grandes alterações no biofilme das cepas testadas, a maioria das cepas continuaram a ser classificadas como formadoras de biofilme forte após o tratamento com essa substância.

O papel do EPS na patogênese tem sido estudado em muitos micro-organismos. Essa substância tem demonstrado uma participação no crescimento do biofilme, além de permitir maior resistência ao tratamento com antimicrobianos e ao sistema imunológico. Foi demonstrado que a expressão gênica diminuída do *locus* pgaABCD, codifica o polissacarídeo extracelular PNAG, levando a um mecanismo de inibição do biofilme (CHOI et al., 2009)

Também avaliamos o efeito de etanol a 2% sobre o biofilme de cepas de *A. baumannii*. Durante esse experimento observamos que o etanol nessa concentração foi capaz de aumentar o biofilme na maioria das cepas que previamente não tinham aderido ao poliestireno, de 13 cepas não aderentes, após a adição de etanol a 2%, sete foram capazes de se tornarem formadoras de biofilme forte. Outros estudos também mostraram que a presença de etanol em baixas concentrações induz um aumento significativo na formação de biofilmes em superfícies abióticas (NWUGO et al., 2012, FIESTER; ACTIS, 2013).

Esse aumento na formação de biofilme está relacionado diretamente com a produção de proteínas envolvidas no anabolismo de lipídios e carboidratos uma resposta que se correlaciona com o aumento na formação de biofilme em superfícies abióticas e diminuição da motilidade bacteriana em superfícies, o que também facilita na adesão dessas células (NWUGO et al., 2012). A presença de etanol também induziu a produção de ácido indol-3-acético (IAA), um hormônio vegetal que na presença de etanol, tem sua produção aumentado, simultaneamente com a tolerância ao estresse, virulência e formação de biofilme (LIN; SHU; LIN, 2018).

O uso indevido de etanol e sua característica volátil podem prejudicar as propriedades antissépticas e desinfetantes dessa substância amplamente utilizada. Assim, devido aos seus efeitos no hospedeiro humano o uso indevido de desinfetantes à base de etanol ou a presença contínua dessa substância podem representar um importante fator ambiental que afetaria a epidemiologia das doenças por *A. baumannii* em pacientes hospitalizados, bem como suas propriedades fisiológicas e de virulência (KAMPF; KRAMER, 2004, DIXON et al., 2008).

Os estudos realizados por MVCL foram importantes para observarmos detalhadamente as estruturas do biofilme e o arranjo das células bacterianas nas cepas classificadas como formadoras de biofilme forte (23SAN e 69SAN), moderado (120SAN), fraco (136SAN) ou não aderente (131SAN).

Após a análise das imagens observamos uma correlação com a classificação realizada a partir do estudo de formação do biofilme de *A. baumannii*. As cepas classificadas como formadores de biofilme forte e moderado apresentaram uma camada mais densa de células vivas e mortas em comparação com as cepas classificadas como biofilme fraco e a que não aderiu ao material.

Em adição, nas cepas classificadas como biofilme forte (23SAN e 69SAN) observamos uma arquitetura clássica de biofilme, consistindo em presença de canais de água (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012). Essa estrutura é induzida pela Bap de *A. baumannii* que é necessária para a formação de biofilme maduro em superfícies clinicamente relevantes, incluindo polipropileno, poliestireno e titânio (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012, DE GREGORIO et al., 2015).

Foi selecionada também, uma cepa (69SAN) classificada como produtora de biofilme forte para observação do efeito do metaperiodato de sódio e das enzimas proteinase K e DNase I na constituição do biofilme. Foram visualizados resultados que confirmam a composição do biofilme visualizado no estudo de sua natureza química. A análise visual do biofilme da cepa 69SAN mostrou que a proteínase K foi capaz de destruir o biofilme formado, porém tanto a

DNase I quanto o metaperiodato de sódio não foram capazes de modificar a classificação do biofilme dessa cepa.

Por fim, resultados obtidos na análise do efeito de etanol a 2% no biofilme de *A. baumannii* também foram confirmados com a análise visual por MVCL. As imagens obtidas por microscopia mostraram um aumento na formação de biofilme desse micro-organismo após a adição de etanol 2% durante 1 h.

O uso indiscriminado de antimicrobianos na UTI, a longa permanência hospitalar, o uso prolongado de cateteres e ventiladores, os implantes e outros instrumentos sintéticos levaram à disseminação de cepas resistentes de *A. baumannii*. É importante identificar os principais fatores de risco para adquirir IRAS, principalmente em UTI, para que haja um melhor gerenciamento e estratégia para a implantação de protocolos práticos, para que comitês de controle de infecção hospitalar ou médicos optem pelas melhores decisões terapêuticas. Essas ações resultariam em uma hospitalização mais curta, aumento nas taxas de sobrevivência, diminuição nos gastos financeiros, diminuição da resistência a antimicrobianos e controle das bactérias resistentes.

6 CONCLUSÃO

- Através do sequenciamento do gene *rpoB* identificamos 72 cepas de *A. baumannii* e quatro cepas de *A. nosocomialis*;
- A análise do polimorfismo genético das cepas de *A. baumannii* por PFGE revelou a presença de 15 pulsotipos (A ao O) entre as 72 cepas, com dois prevalentes (A e B) que juntos agruparam 43% das cepas;
- A análise do polimorfismo genético das cepas de *A. baumannii* selecionadas por MLST identificou quatro CC (103, 231, 235 e 229), de acordo com o esquema Oxford e cinco CC (1, 10, 15, 162 e 213), de acordo com o esquema Pasteur. Pelo esquema Oxford, os CC 103, 231 e 235 e pelo esquema Pasteur os CC 1, 15, 162, 213 já foram descritos no Brasil, sendo relatados em diversos estados;
- Pelo esquema Oxford apenas a um ST (ST305) não foi atribuído CC, já pelo esquema Pasteur a todos os ST foram atribuídos CC;
- Foram determinados dois novos ST, um pelo esquema Oxford (ST2097), que foi agrupado no CC231 e um pelo esquema Pasteur (ST1439), que foi agrupado no CC1;
- A maioria das cepas de *A. baumannii* foi classificada como multirresistentes (MDR) ou extensivamente resistentes (XDR) (62% e 35%, respectivamente), sendo revelados altos níveis de resistência a maioria dos antimicrobianos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções por *A. baumannii*;
- Os antimicrobianos mais eficazes pertenceram a classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), tetraciclina (minociclina) e lipopeptídeos (polimixina B), com aproximadamente 50%, 100% e 80% de suscetibilidade, respectivamente;
- O gene *bla_{OXA-23}* foi detectado em todas as cepas analisadas, sugerindo que este seja o principal mecanismo de resistência aos carbapenemas. Em contrapartida, apenas em uma cepa foi detectada a presença de outro gene de oxacilinases (*bla_{OXA-24}*). Em nenhuma cepa foi detectada a presença do gene *mcr-1*;
- A presença de heterorresistência à polimixina B foi demonstrada em 36% das cepas suscetíveis a esse antimicrobiano, porém a resistência adaptativa não foi demonstrada em nenhuma cepa;
- A maioria das cepas incluídas no estudo (82%) foi produtora de biofilme, sendo o fenótipo moderado o mais prevalente entre as cepas;

- Podemos sugerir que o biofilme formado pelas cepas de *A. baumannii* formadoras de biofilme forte é predominantemente de natureza proteica, podendo possuir pouca ou nenhuma presença de carboidratos e DNA nessa composição;
- Observamos que etanol na concentração de 2% possui um efeito positivo na formação de biofilme de *A. baumannii*;
- A visualização do biofilme por MVCL mostrou resultados condizentes com as classificações realizadas no estudo, confirmando a natureza química do biofilme;
- As imagens obtidas por MVCL do biofilme após a adição de etanol a 2% também mostraram que o etanol foi capaz de favorecer a formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, S.H. et al. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. **BMCO Phthalmol**, v.13, p.57, 2013.
- ADAMS, M.D. et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.9, p.3628–3634, 2009.
- ADAMS-HADUCH, J.M. et al. Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania. **Antimicrob Agents and Chemother**, v.52, n.11, n.3837-3843, 2008.
- 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.3849–3854, 2011.
- AFZAL-SHAH, M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.2, p.583-588, 2001.
- AGHAZADEH, M. et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Microb Drug Resist**, v.19, n.4, p.282–288, 2013.
- AHMED, S.S.; ALP, E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. **J Infect Dev Ctries**, v.9, v.4, p.347-354, 2015.
- AKERS, K.S. et al. Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex from a U.S. military hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.6, p.2693-2695, 2009.
- ALBRECHT, M.C. et al. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. **J Am Coll Surg**, v.203, n.4, p.546-550, 2006.
- AL-HASSAN, L.; EL MAHALLAWY, H.; AMYES, S.G. First report of *bla*_{PER-3} in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v.41, n.1, p.93–94, 2013.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; CULEBRAS, E.; PICAZO, J.J. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? **Infect Genet Evol**, v.12, n.2, p.345-349, 2012.
- AMIN, M. et al. Association Between Biofilm Formation, Structure, and the Expression Levels of Genes Related to biofilm formation and Biofilm-Specific Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Burn Infection in Ahvaz. **Iran Infect Drug Resist**, v.12, p3867–3881, 2019.

AMINOV, R.I. Evolution in action: dissemination of tet(X) into pathogenic microbiota. **Front Microbiol**, v. 4, p. 192, 2013.

ANTUNES, L.C. et al. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. **PLoS One**, v.6, n.8, e22674, 2011.

ANTUNES, L.C.; VISCA, P.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis**, v.71, n.3, p.292–301, 2014.

ARANDA, J. et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. **J Bacteriol**, v.193, p.3740–3747, 2011.

ARROYO, L.A. et al. The PmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.3743–3751, 2011.

ASENSIO, A. et al. Prevalence of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain (1999-2005). **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.26, n.4, p.199-204, 2008.

AUDET, A.; NANTEL, G.; PROULX, P. Phospholipase A activity in growing *Escherichia coli* cells. **Biochim Biophys Acta**, v.348, p.334–343, 1974.

AZIMI, L. et al. Characterization of carbapenemases in extensively drug resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. **Int J Mol Cell Med**, v.4, n.1, p.46–53, 2015.

AZIZI, O. et al. Molecular Analysis and Expression of bap Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Rep Biochem Mol Biol**, v., p.62-72, 2016.

BADAVE G.K; KULKARNI D. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. **J Clin Diagn Res**, v.9, n.1, p.DC08–DC10, 2015.

BAHADOR, A. et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel international clone variants. **Microb Drug Resist**, v.19, n.5, p.397–406, 2013.

BAKOUR, S. et al. First report of 16SrRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. **J Infect Chemother**, v.20, n. 11, p.696–701, 2014.

BARIN, J. et al. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.2, p.12-15, 2013.

BARNAUD, G. et al. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. **J Hosp Infect**, v.76, p.358–360, 2010.

- BARTUAL, S.G. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v.43, n.9, p.4382-4390, 2005.
- BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New treatment options against gram-negative organisms. **Crit Care**, v.15, n.2, p.215, 2011.
- BECEIRO, A. et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.7, p.3370-3379, 2011.
- BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chem Biol**, v.8, n.1, p.105-115, 2013.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev**, v.9, n.2, p.148-165, 1996.
- BHAGAN-BRUNO, S.; LATHER, N.; FERGUS, I.V. *Acinetobacter* endocarditis presenting as a large right atrial mass: an atypical presentation. **Echocardiography**, v. 27, n.4, p.39-42, 2010.
- BHARGAVA, N.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. **Crit Rev Microbiol**, v.36, p.349-360, 2010.
- BIANCO, C. et al. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Arch Microbiol**, v.185, n.4, p.373-382, 2006.
- BIENDO, M. et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using a combination of antibiotyping and ribotyping. **J Clin Microbiol**, v.37, n.7, p.2170-2175, 1999.
- BONNIN, R.A. et al. PER-7 an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.5, p.2424-2427, 2011.
- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, n.Supplement 2, p.S49-S56, 2006.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int J Syst Bacteriol**, v.36, p.228-240, 1986.
- BRASILIANSE, D. et al. Diversity of metallo- β -lactamase-encoding genes found in distinct species of *Acinetobacter* isolated from the Brazilian Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.114, 2019.
- BRESLOW, J.M. et al. Morphine, but not trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infection. **J Neuroimmune Pharmacol**, v.6, n.4, p.551-565, 2011.

- BRIGANTE, G. et al. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. **J Med Microbiol**, v.61, p.653–661, 2012.
- BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infect Immun**, v.80, n.1, p.228-233, 2012.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969–976, 2010
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n.6, p. 1211-1233, 1995.
- BUTLER, D.A. et al. Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: Resistance by Any Other Name Would Still be Hard to Treat. **Curr Infect Dis Rep**, v.21, n.12, p.46, 2019.
- ÇAĞLAN, E. et al. Resistance and heteroresistance to colistin among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v.9, p.1-5, 2019.
- CAI, Y. ET AL. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.7, p.1607–1615, 2012.
- CALDART, R.V. et al. *Acinetobacter baumannii* infections in Amazon Region driven by extensively drug resistant international clones, 2016-2018. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.114, 2019.
- CALDWELL, S. J; BERGHUIS, A. M. Small-angle x-ray scattering analysis of the bifunctional antibiotic resistance enzyme aminoglycoside (6') acetyltransferase-Ie aminoglycoside (2') phosphotransferase-Ia reveals a rigid solution structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.4, p.1899 –1906, 2012.
- CAMARENA, L. et al. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. **PLoS Pathog**, v.6, n.4, e1000834, 2010.
- CARRETTO, E. et al. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. **Infect Genet Evol**, v.11, n.6, p.1319-1326, 2011.
- CARVALHO, K.R. et al. Dissemination of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.1, p.25-8, 2009.
- CASCIO, A. et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. **Int J Infect Dis**, v.14, n.7, p.272-279, 2010.
- CASTILHO, S.R.A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS One**, v.12, e0176790, 2017.

CASTILHO, S.R.A., et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS One**, v.12, e0176790, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004 (Reprinted from MMWR, vol 53, pg 1063-1066, 2004). **JAMA**, v.53, p.1063-1066, 2004.

CHAGAS, T.P, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.79, n.4, p.468-472, 2014.

CHANG, W.N. et al. Community-acquired *Acinetobacter* meningitis in adults. **Infection**, v.28, n.6, p.395-397, 2000.

CHEN, H.P. et al. Predictors of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia. **J Microbiol Immunol Infect**, v.38, n.2, p.127-136, 2005.

CHEN, T.L. et al. Acquisition of a plasmid-borne blaOXA-58 gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.7, p.2573–2580, 2008.

CHIM, H.; TAN, B.H.; SONG, C. Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of *Acinetobacter baumannii* in a tropical climate. **Burns**, v.33, n.8, p.1008-1014, 2007.

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.185–190, 2009.

CHOI, A.H. et al. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetyl glucosamine PNAG that is critical for biofilm formation. **J Bacteriol**, v.191, n.19, p.5953–5963, 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.1127–1138, 2005.

CHOI, C.H. et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiol**, v.8, p.216, 2008.

CHOPRA, T. et al. Epidemiology of bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii* and impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.12, p.6270–6275, 2013.

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors, **Drug Resist Updat**. vol. 5, p. 119-125, 2002.

CHU, H. et al. Sulbactam-Based Therapy for *Acinetobacter baumannii* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Braz J Infect Dis**, v.17, p.389–394, 2013.

CHUANG, Y.C et al. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Infect Dis**, v.52, n.3, p.352-360, 2011.

CISNEROS, J.M.et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clin Infect Dis**, v.22, n.6, p.1026-1032, 1996.

CLEMMER, K.M.; BONOMO, R.A.; RATHER, P.N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**, v.157, p.2534-2544, 2011.

CLÍMACO E.C. et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infect Genet Evol**, v.19, p.127-133, 2013.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S25. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2019.

COELHO-SOUZA, T. et al. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. **Clin Microbiol Infect**, v.19, n.5, p.241–244, 2013.

CORREA, L.L. et al. Detection of *bla*OXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. **Braz J Infect Dis**, v.16, p.521–526, 2012.

COSGAYA, C. et al. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 66, 4105–4111, 2016

CRNICH, C.J.; SAFDAR, N.; MAKI, D.G. The role of the intensive care unit environment in the pathogenesis and prevention of ventilator-associated pneumonia. **Respir Care**, v.50, n.6, p.813-838, 2005.

CUSTOVIC, A. et al. Epidemiological monitoring of nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. **Med Arch**, v.68, n.6, p.402-406, 2014.

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

DA SILVA, G.J; DOMINGUES, S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics (Basel)**, v.6, p.4, p.E28, 2017.

D'AGATA, E.M.; THAYER, V.; SCHAFFNER, W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.21, n.9, p.588-591, 2000.

DAI, T. et al. Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. **Chin Med J (Engl)**, v.123, n.18, p. 2571-2575, 2010.

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.557–562, 2008.

- DE AZEVEDO, F.K.S.F. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes, **J Med Microbiol**, v.68, n.1, p.31-40, 2019.
- 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.213-218, 2009.
- DE GREGORIO, E. et al. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. **BMC Genomics**, v.6, p.933, 2015.
- DE JONGE, B.L. et al. Effect of exogenous glycine on peptidoglycan composition and resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, p.1498–1503, 1996.
- DE SA CAVALCANTI, F.L. et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.77, n.3, p.250-251, 2013.
- DEMIRDAL, T.; SARI, U.S.; NEMLI, S.A. Is inhaled colistin beneficial in ventilator associated pneumonia or nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*? **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.15, n.1, p.1–6, 2016.
- 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, p. 297-303, 2014.
- DEXTER, C. et al. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.13, n.5, p.567-573, 2015.
- DIANCOURT, L. et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. **PLoS ONE**; v.5, e10034, 2010.
- DIAS, V.C. et al. Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a Brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb. Drug Resist**, v.23, p.852–863, 2017.
- DIJKSHOORN, L. et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. **J Clin Microbiol**, v.34, n.6, p.1519-1525, 1996.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.12, p.939–951, 2007.
- DIXON, B. There's the rub: infection control that spreads infection. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.2, p.91, 2008.

DOI, Y. et al. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.11, p.4209–4210, 2007.

DOI, Y. et al. Screening for *Acinetobacter baumannii* colonization by use of sponges. **J Clin Microbiol**, v.9, n.1, p.154-158, 2010.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**, v.45, n.1, p.88–94, 2007.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.6, p.2287–2288, 2008.

DOMENICO, E.G.D.et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **Int J Mol Sci**, v.18, e1077, 2017

DUARTE, A. et al. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, n.45, p.29–33, 2016.

EDWARDS, J.; PATEL, G.; WAREHAM, D.W. Low concentrations of commercial alcohol hand rubs facilitate growth of and secretion of extracellular proteins by multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. **J Med Microbiol**, v.56, p.1595-1599, 2007.

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

EIJKELKAMP, B.A. et al. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Genomics**, v.15, p.1020, 2014.

EL-HALFAWY, O.M. VALVANO, M.A. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. **PLoS One**, 8e68874, 2013.

ELLIS, T.N.; KUEHN, M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.74, n.1, p.81-94, 2010.

ESPINAL P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J Hosp Infect**, v.80, n.1 ,p.56-60, 2012.

ESPINAL, P. et al. First report of an OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate to Tn2006 in Spain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, p.589–591, 2013.

ESTERLY, J. et al. Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. **Ann Pharmacother**, v.45, n.2, p.218-228, 2011.

EVANS, B.A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S.G. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Curr Pharm Des**, v.19, n.2, p.223-238, 2013.

- EZE, E.C.; CHENIA, H.Y.; EL ZOWALATY, M.E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infect Drug Resist**, v.11, p.2277–2299, 2018.
- FALAGAS, M.E. et al. Community-acquired *Acinetobacter* infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.26, n.12, p.857-868, 2007.
- FALAGAS, M.E. et al. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Antimicrob Agents**, v.45, n.5, p.455-460, 2015.
- FALAGAS, M.E. et al: Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.2, p.101–104, 2008.
- FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. **Crit Care**, v.11, n.3, p.134, 2007.
- FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; MATTHAIYOU, D.K. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resist Updat**, v.13, n.4-5, p.132–138, 2010.
- FAN, B. et al. Activity of Colistin in Combination with Meropenem, Tigecycline, Fosfomycin, Fusidic Acid, Rifampin or Sulbactam against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Murine Thigh-Infection Model. **PLoS ONE**, v.11, n.6, e0157757, 2016.
- FARAJNIA, S. et al. Prevalence of PER and VEB type extended spectrum beta-lactamases among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in North-West of Iran. **Iran J BasicMed Sci**, v.16, n.6, p.751–755, 2013.
- FARRINGTON, C.A.; ALLON, M. Complications of hemodialysis catheter bloodstream infections: Impact of infecting organism. **Am J Nephrol**, v.50, n.2, p.126–132, 2019.
- FEIZABADI, M.M. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*_{OXA} genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. **Jpn J Infect Dis**, v.61, n.4, p.274-278, 2008.
- FIESTER, S.E; ACTIS, L.A. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiol**, v.8, n.3, p.353–365, 2013.
- GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, v.4, n.3, p.273-278, 2009.
- 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 the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infect. Immun**, v.77, n.8, p.3150–3160, 2009.
- GAIARSA, S. et al. Comparative Analysis of the Two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. **Front Microbiol**, v.10 p.930, 2019.
- GALES A.C. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates:

Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). **Open Forum Infectious Diseases**, v.6, p.S34–S46, 2019.

GALES, A.C. et al. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). **Clin Infect Dis**, v.32, p.104-13, 2001.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of gram-negative pathogens: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006–09). **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.9, p.2070–2074, 2011.

GARNEAU-TSODIKOVA, S., LABBY, K.J. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. **Medchemcomm**, v.7, n.1, p.11-27, 2016.

GARZONI, C. et al. Atypical infections in tsunami survivors. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.10, p.1591-1593, 2005.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**, v.41, n.6, p.848-854, 2005.

GAZEL, D.; TATMAN OTKUN, M.; AKÇALI, A. In vitro activity of methylene blue and eosin methylene blue agar on colistin-resistant *A. baumannii*: an experimental study. **J Med Microbiol**, v.68, n.11, p.1607-1613, 2019.

GENTELUCI, G.L et al. Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. **J. Bras Patol Med Lab**, v.52, n.2, p.91-95, 2016.

GENTELUCI, G.L. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: differential adherence to HEp-2 and A-549 cells. **Braz J Microbiol**, p.1-8, 2020.

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.

GISKE, C.G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.3, p.813–821, 2008.

GOH, H.M. et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Appl Environ Microbiol**, v.79, n.21, p.6535-6543, 2013.

GOLDBERG, E.; Bishara, J. Contemporary unconventional clinical use of co-trimoxazole. **Clin Microbiol Infect**, v.18, p. 8-17, 2012.

GOMES, D.B. et al. Presence of the *bla_{OXA-72}* gene in *Acinetobacter baumannii* from a public hospital in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist.**, v.5, p.90-91, 2016.

GOMES, D.B.C et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência de resistência à polimixina no Rio de Janeiro. **Vigil sanit debate**, v.4, n.3, p.28-34, 2016.

- GONZÁLEZ, R.H.; NUSBLAT, A.; NUDEL, B.C. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. **Microbiol Res**, v.155, n.4, p.271-277, 2001.
- GOODMAN, L; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil, 2006.
- GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, n.3, p.219–216, 2010.
- GRAÑA-MIRAGLIA, L. et al. First Genome Sequence of a Mexican Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate. **Genome Announc**, v.4, n.2, e00156-16, 2016.
- GREENE, C. et al. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Lett Appl Microbiol**, v.63, p.233–239, 2016a.
- GREENE, C. et al. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Am J Infect Control**, v.44, e65–e7, 2016b.
- GREIG, S.L.; SCOTT, L.J. Intravenous minocycline: a review in *Acinetobacter* infections. **Drugs**, v.76, p.1467–1476, 2016.
- GRIFFITH, M.E. et al. *Acinetobacter* skin colonization of US Army Soldiers. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.27, n.7, p.659-661, 2006.
- GRIFFITH, M.E. et al. Minocycline therapy for traumatic wound infections caused by the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. **Infect Dis Clin Pract**, v.16, n.1 ,p.16-19, 2008.
- GROSSO, F. et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.1, p.62-65, 2011.
- GUNDI, V.A. et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiol**, v.155, p.2333-2341, 2009.
- GUNN, J.S.; BAKALETZ, L.O.; WOZNIAK, D.J. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. **J Biol Chem**, v.291, n.24, p.12538-12546, 2016.
- GURUNG, J. et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian J Crit Care Med**, v.17, p.214–218, 2013.
- HALFAWY, O.M.; VALVANO, M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clin Microbiol Rev**, v.28, p.191–207, 2015.
- HAMEED, F. et al. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.52, 2019

HAMIDIAN, M. et al. RCH51, a multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* ST103IP isolate, carries resistance genes in three plasmids, including a novel potentially conjugative plasmid carrying oxa235 in transposon Tn6252. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n.7, p.1907-1910, 2017.

HAMOUDA, A. et al. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of blaOXA-51-like genes. **J Clin Microbiol**, v.48:p.2476–2483, 2010.

HANNA, H. et al. Central venous catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: significance of catheter removal in preventing relapse. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.25, n.8, p.646-649, 2004.

HARDING, C.M. et al. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. **J Biol Chem**, v.292, p.9075–9087, 2017.

HAWLEY, J.S.; MURRAY, C.K.; JORGENSEN, J.H. Heterorresistência da colistina em *Acinetobacter* e sua associação com a terapia prévia com colistina. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.351-352, 2008.

HELAL, S. et al. The Role of MDR-*Acinetobacter baumannii* in Orthopedic Surgical Site Infections. **Surg Infect (Larchmt)**, v.16, n.5, p.518-522, 2015.

HENRY, R. et al. The transcriptomic response of *Acinetobacter baumannii* to colistin and doripenem alone and in combination in an in vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics model. **J Antimicrob Chemother**, v.70, p.1303–1313, 2015.

HERITIER, C. et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.10, p.4174-4179, 2005.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.2, p.123–130, 2006.

HIGGINS, P.G. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Chemother**, v.65, n.2, p.233-238, 2010.

HIGGINS, P.G. et al. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.12, p.5035-5038, 2009.

HIGGINS, P.G. et al. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.5, p.2121-2126, 2013.

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. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, p.305–314, 2010.

HINDLER, J.A.; HUMPHRIES, R.M. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **J Clin Microbiol**, v. 51, n.6, p. 1678–84, 2013.

HINRICHSEN, S.L. et al. Occurrence of *Acinetobacter* in two private tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Rev Panam Infectol**, v.1, p.174–179, 2014.

HONG, S.B. et al. Co-existence of *bla*_{OXA-23} and *armA* in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a hospital in South Korea. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 836–844, 2013.

HOOD, M. et al. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. **Infect Immun**, v.81, n.2, p.542–551, 2013.

HOOD, M.I. et al. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.1029–1041, 2010.

HOSHI, A. et al. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. **Proc. Natl Acad Sci USA**, v.106, n.15, p.6416–6421, 2009.

HOUANG, E.T. et al. Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. **J. Clin. Pathol**, v.51, n.10, p.786–788, 1998.

HUANG, G. et al. Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Curr Microbiol**, v.66, p.535–543, 2013.

HUOVINEN, P. Resistance to trimethoprim–sulfamethoxazole. **Clin Infect Dis**, v.32, p. 1608-1614, 2001.

IWASHKIW, J.A. et al. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. **PLoS Pathog**, v.8, n.6, e1002758, 2012.

JACOBS, A.C. et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Infect Immun**, v.78, n.5, p.1952-1962, 2010.

JACOME, P.R.L.A. et al. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. From cancer patients with healthcare-associated infections. **J Med Microbiol**, v.65, p.658–665, 2016.

JANG, T.N. et al. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. **J Hosp Infect**, v.73, n.2, p.143-150, 2009.

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

JOHNSON, E.N.; MARCONI, V.C.; MURRAY, C.K. Hospital-acquired device-associated infections at a deployed military hospital in Iraq. **J Trauma**, v.4, n.4, p.157-163, 2009.

JOLY-GUILLOU, M.L. et al. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect**, v.11, n.11, p.868-873, 2005.

JUNG, J.Y. et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. **BMC Infect Dis**, v.10, p.228, 2010.

KAMPF, G.; KRAMER, A. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. **Clin Microbiol Rev**, v.17, n.4, p.863–893, 2004.

KANAMORI, H. et al. Next-Generation Sequencing and Comparative Analysis of Sequential Outbreaks Caused by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at a Large Academic Burn Center. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, n.3, p.:1249-1257, 2015.

KARAH, N. et al. Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. **J Med Microbiol**, v.60, p.515–521, 2011.

KARAH, N.A. et al. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. **Drug Resist Update**, v.15, n.4, p.237–247, 2012.

KEEN, E.F. 3rd et al. Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. **Burns**, v.36, n.6, p.819-825, 2010.

KEEN, E.F. 3rd. et al. Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. **Burns**, v.36, n.6, p.819-825, 2010.

KHAN, I.D et al. A Device-Associated Healthcare-Associated Infections (DA-HAI) and the caveat of multiresistance in a multidisciplinary intensive care unit. **Med J Armed Forces India**. v.73, n., p.222-231, 2017.

KIM, S.W. et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. **FEMS Microbiol Lett**, v.301, n.2, p.224–231, 2009.

KIM, Y. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.79, p.362–366, 2014.

KING, L.B. et al. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.55, n.3, p.414-421, 2009.

KNAPP, S. et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. **Am J Respir Crit Care Med**, v.173, n.1, p.122-129, 2006.

KO, K.S. et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.5, p.1163–1167, 2007.

KOCHAR, M. et al. Deletion of TnAbaR23 results in both expected and unexpected antibiogram changes in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p. 1845-1853, 2012.

KOŁPA, M. et al.. Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. **Int J Environ Res Public Health**, v.15, n.1, 2018.

KONG, K, F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. **APMIS**, v.118, n.1, p.1–3, 2010.

KROL, V.; HAMID, N.S.; CUNHA, B.A. Neurosurgically related nosocomial *Acinetobacter baumannii* meningitis: report of two cases and literature review. **J Hosp Infect**, v.71, n.2, p.176-180, 2009.

KUMAR, S.S.; VENGADASSALAPATHY, L.; MENON, T. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter baumannii* complex. **Indian J Pathol Microbiol**, v.51, n.4, p.573, 2008.

LA SCOLA, B, et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol**, v.44, n.3, p.827–832, 2006.

LANDMAN, D. et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.1, p.78–82, 2007.

LAVERTY, G.; GORMAN S. P.; GILMORE B. F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. **Pathogens**, v.3, n.3, p.596–632, 2014.

LEAN, S.S. et al. Prevalence and genetic characterization of carbapenem- and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Terengganu, Malaysia. **ISRN Microbiol**, 2014.

LEANGAPICHART, T. et al. Acquisition of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. **Antimicrob Agents Chemother**, pii: AAC.01486-1, 2016.

LEE, C.R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Front Cell Infect Microbiol**, v.7, p.55, 2017.

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, 2008.

LEE, J.C. et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Res Microbiol**, v.157, p.360-366, 2006.

- 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.4485-4491, 2005.
- LEE, M.J. et al. Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p.29–34, 2014.
- LEE, Y. et al. Dissemination of ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 in Korea. **J Appl Microbiol**, v.112, p.1207–1211, 2012.
- LEES-MILLER, R.G. et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. **Mol Microbiol**, v.89, n.5, p.816-830, 2013.
- LESHO, E. et al. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel *pmrCAB* operon during colistin therapy of wound infections. **J Infect Dis**, v.208, n.7, p.1142–1151, 2013.
- LI, J. et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.9, p.2946–2950, 2006.
- LI, J. et al. Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and colistin in a critically ill patient receiving continuous venovenous hemodiafiltration, **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.4814-4815, 2005.
- LIAKOPOULOS, A. et al. Identification of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010–2011. **Euro Surveill**, v.17, p.1–3, 2012.
- LIM, S.K. First Detection of the *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Livestock between 2013 and 2015 in South Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, n.11, p.6991–6993, 2016.
- LIM, T.P. et al. Multiple genetic mutations associated with polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.59, n.12, p.7899-7890, 2015.
- LIMA ET AL. Downloaded by Tulane University from www.liebertpub.com at 01/09/20. For personal use only.
- LIMA, J.L.C. et al. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in La R protein of isolates non biofilm-producing. **Braz J Infect Dis**, v.22, p.129–136, 2018.
- LIMA, W.G. et al.. Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. **Clin Microbiol Infect**, v.37, n.6, p.1009-1019, 2018.
- LIN, D.L. et al. Inhibition of Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Type Ib by Zinc: Reversal of Amikacin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* by a Zinc Ionophore. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.7, p.4238–4241, 2014.

- LIN, H.R.; SHU, H.Y.; LIN, G.H. Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiol Res**, v.216, p.30-39, 2018.
- 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, 2014.
- LITAKE, G.M. et al. 2009. PER-1-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from India. **Int J Antimicrob Agents**, v.34 p.388-389, 2009.
- LIU, Y.Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, v.16, n.2, p.161-168, 2016.
- 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.1036-1044, 2008.
- LORENZONIA, V.V. et al. Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil, **Braz J Infect Dis**, v.22, n.4, 2018.
- LOWINGS, M. et al. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa - an update. **BMC Infect Dis**, v.15, p.521, 2015.
- LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. Acesso em: 05 mar 2020.
- LU, P.L. et al. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.641–647, 2009.
- LUKE, N.R. et al. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. **Infect Immun**, v.78, n.5, p.2017–2023, 2010.
- LYYTIKÄINEN, O. et al. Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. **J Hosp Infect**, v.31, n.1, p.41-54, 1995.
- MACHADO, G.M. et al. Occurrence and the susceptibility to antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. at a tertiary hospital in southern Brazil **Rev. Soc Bras Med Trop**, v.44, n.2, 2011.
- MAEGELE, M. et al. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. **Crit Care Med**, v.33, n.5, p.1136-1140, 2005.
- 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.5, p.268-281, 2012.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance–nodulation–cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.12, p.3375–3380, 2001.

MAI, M.H. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in ventilator-associated pneumonia at a medical center in southern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, v.40, n.5, p.401–405, 2007.

MAIDEN, M.C.J. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n.6, p. 3140-3145, 1998.

MAK, J.K. et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.63, n.1, p.47-54, 2009.

MALINVERNI, J.C.; SILHAVY, T.J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, p.8009–8014, 2009.

MANAGEIRO, V. JONES-DIAS, D.E.; FERREIRA, D. L. Antimicrobial Resistance Surveillance Program In Portugal, and M. Canica. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. **Int J Antimicrob Agents**, v.40, p.398–403, 2012.

MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N.P. Multidrug Resistant *Acinetobacter*. **J Glob Infect Dis**, v.2, n.3, p. 291–304, 2010.

MANN, E.E. et al. Modulation of eDNA release and degradation effects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS One**, v. 4, n.6, e5822, 2009.

MARAGAKIS, L.L. et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. **JAMA**, v.292, n.24, p.3006-3011, 2004.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis**, v.46, n.8, p.1254-1263, 2008.

MARTINS, N. et al. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: reflection of a global expansion. **Infect Genet Evol**, v.20, p.378–380, 2013a.

MARTINS, N. et al. Imported and Intensive Care Unit-Born *Acinetobacter baumannii* Clonal complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. **Microb. Drug Resist**, v.19, n.3, p.216-223, 2013b.

MASTERS, P.A. et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. **Arch Intern Med**, v.163, n.4, p.402-410, 2003.

McCONNELL, M.J. et al. Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment. **J Clin Microbiol**, v. 50, n.4, p.1412–1414, 2012.

- McCONNELL, M.J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol Rev**, v.37, n.2, p.130-155, 2013.
- McQUEARY, C.N.; ACTIS, L.A. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. **J Microbiol**, v.49, n.2, p.243-250, 2011.
- MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **J Bras Patol Med Lab**, v.49, n.6, p.391-405.
- MELETIS, G. et al. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.4, p.946–947, 2011.
- MENON, T. et al. Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex--a case report. **Indian J Pathol Microbiol**, v.49, n.4, p.576-578, 2006.
- MINANDRI, F. et al. Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. **J Clin Microbiol**, v.50, n.3, p.590-597, 2012.
- ITSUDA, T. Molecular epidemiology of multidrug-resistant organisms. **Nihon Rinsho**, v.70, n.2, p.201-204, 2012.
- 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, 2010.
- MOFFATT, J.H., et al. Insertion sequence IS*Aba11* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.3022–3024, 2011.
- MOON, K.H.; WEBER, B.S.; FELDMAN, M.F. Subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole prevent biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* through inhibition of *Csu pili* expression. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, p.e00778-17, 2017.
- MOSKOWITZ, C. et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.42, n.5, p.1915-1922, 2004.
- MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide Dissemination of the *bla*_{OXA23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.1, p.35-40, 2010.
- MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.191, n.7, p.2414–2418, 2009.
- MUGNIER, P.D. et al. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.1, p.35-40, 2010.

MURRAY, C.K. et al. Bacteriology of war wounds at the time of injury. **Mil Med**, v.171, n.9, p.826-829, 2006.

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

MUSSI, M.A. et al. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. **J Bacteriol**, v.192, n.24, p.6336-6345, 2010.

NAAS, T. et al. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. **Emerg Infect Dis**, v.12, n.8, p. 214–222, 2006.

NAAS, T.; NORDMANN, P.; HEIDT, A. Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. **Int J Antimicrob Agents**, v.29, n.2, p.226–228, 2007.

NAJAR PEERAYEH, S.; KARMOSTAJI, A. Molecular Identification of Resistance Determinants, Integrons and Genetic Relatedness of Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated From Hospitals in Tehran, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v.8, n.7, e2702, 2015.

NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, CDC, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne and Diarrheal Diseases Branch. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria. Manual de Procedimientos Laboratorio – Traducción del “Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis”. Buenos Aires, 2004.

NEELY, A.N. A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. **J Burn Care Rehabil**, v.21, n.6, p.523-527, 2010.

NEIDELL, M.J. et al. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clin Infect Dis**, v.55, n.6, p.807-815, 2012.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **Int. J Syst Evol Microbiol**, v.65, p.934–942, 2015.

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, 2011.

NEMEC, et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. **J Antimicrob Chemother**, v.62, n.3, p.484-489, 2008.

NI, W. et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, p.3215–3218, 2016.

NIGRO, S. J.; POST, V.; HALL, R. M. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.7, p. 1504–1509, 2011.

NIU, C. et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.190, n.9, p.3386-3392, 2008.

NOWAK, J. et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. **J Antimicrob Chemother**, v.72, n.12, p.3277-3282, 2017.

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, e51936, 2012.

OBEIDAT, N. et al. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients respiratory tract sources. **Am J Infect Control**, v.42, p.401-104, 2014.

OLUT, A.I.; ERKEK, E. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. **Scand J Infect Dis**, v.37, n.11-12, p.919-921, 2005.

OPAZO, A. et al. Novel genetic structure harbouring *bla_{PER-1}* in ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from Kuwait. **Int J Antimicrob Agents**, v.43, n.4, p.383–384, 2014.

OPAZO, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J Infect Dev Countries**, v.6, p.311–316, 2012.

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Post-surgical meningitis due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. Effective treatment with intravenous and/or intraventricular colistin and therapeutic dilemmas. **Med Mal Infect**, v.37, n.2, p.124-125, 2007.

PARASKEVI, C. et al. The Role of Minocycline in the Treatment of Nosocomial Infections Caused by Multidrug, Extensively Drug and Pandrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review of Clinical Evidence. **Microorganisms**, v.7, n.6, p.159, 2019.

PARK, Y.K. et al. Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.64, p.43–45, 2009.

PASTERÁN, F. et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n.9, p.3222–3224, 2006.

PATERSON, D.L.; HARRIS, P.N.A. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. **Lancet Infect Dis**, v.16, n.2, p.132-133, 2016.

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

PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.10, p.3471-3484, 2007.

PEREZ, L.R. *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. **J Chemother**, 27:13–16. 2015.

PIOLETTI, M. et al. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. **EMBO J**, v.20, n.8, p;1829-39, 2001.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.1, p.24-38, 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.9, p.826–836, 2006.

POLOTTO, M. et al. Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.53, 2020.

POLOTTO, M. et al. Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.53, e20190044, 2020.

POTRON, P.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Int J Antimicrob Agents**, v.45, n.6, p.568–585, 2015.

POURNARAS, S. et al. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. **J Med Microbiol**, v.56, p.66–70, 2007.

QI, L. et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Front Microbiol**. 7:483. 016

QIN Z, Ou Y, Yang L, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v.153, n.7, p.2083–2092, 2007.

QUEENAN, A.M; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin Microbiol**, v.20, n.3, p.440–458, 2007.

RAFEI, R. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. **PLoS One**, v.9, n.12, e115969, 2014.

RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug Resist Updat**, v.13, n.6, p.151-171, 2010.

RAO, R.S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Ind J Med Microbiol**, v.26, p.333-337, 2008.

RAVASI, P. et al. ISAb_a825, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and bla_{OXA-58} expression in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.2, p.917–920, 2011.

REITER, K.C. et al. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. **APMIS**, v.119, p.776–781, 2011.

RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**, v.197, n.8, p.1079-1081, 2008

ROBERTS, M.C. Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. **Front Microbiol**, vol. 2, p.40, 2011.

ROBERTS, S.A.; FINDLAY, R.; LANG, S.D. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **J Hosp Infect**, v.48, n.3, p.228-232, 2001.

ROBLEDO, I.E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.:1354–1357, 2010.

ROCA, I. et al. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. **Front Microbiol**, v.3, p.148, 2012.

ROCHA, L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. **J Bras Patol Med Lab**, v. 53, n. 6, p. 358-361, 2017.

RODRÍGUEZ GUARDADO, A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. **J Antimicrob Chemother**; v.61, n.4, p.908-913, 2008.

RODRIGUEZ, C.H. et al. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.65, p.188–191, 2009.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clin. Microbiol. Infect**, v.14, p.276–278, 2015.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.25, n.10, p.819-824, 2004.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. **Am J Infect Control**, v.37, n.9, p.715-722, 2009.

ROMANIN, P. et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Hospital from Brazil: The Importance of Carbapenemase Encoding Genes and Epidemic Clonal Complexes in a 10-Year Study. **Microb Drug Resist**, v.25, n.9, p.1365-1373, 2019.

- ROYER, S. et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla*OXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v.13, n.6, e0198643, 2018.
- RUIZ, M. et al. Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **FEMS Microbiol Lett**, v.274, n.1, p.63–66, 2007
- RUMBO, C. et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.7, p.3084-3090, 2011.
- RUMBO-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, 2013.
- RUSSO, T.A. et al. *In vivo* and *in vitro* activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.4, p.867-873, 2011.
- SAAVEDRA SY, et al. . 2014. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. **Braz J Infect Dis**, v.18, p.678–680, 2014.
- SAÇAR, S. et al. Successful treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. **J Infect Dev Ctries**, v.1, n.3, p.342-344, 2007.
- SADER, H. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis**, v.5, n.4, p.200-214, 2001.
- SAHU, P.K. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and its role in biofilm formation. **ScientificWorld Journal**, e973436, 2012
- SÁNCHEZ, C.J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infect Dis**, v.13, p.47, 2013.
- SAUVAGE, E. et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol Rev**, v.32, n.2, p.234–258, 2008.
- SCOTT, P. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. **Clin Infect Dis**, v.44, n.12, p.1577-1584, 2007.
- SEBENY, P.J.; RIDDLE, M.S.; PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clin Infect Dis**, v.47, n.4, p.444-449, 2008.
- SEGAL, H.; GARNY, S. & ELISHA, B. G. Is ISAb-1 customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiol Lett**, v.243, p.425-429, 2005.
- SEIFERT, H. et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v.43, p.4328-4335, 2005.

SEIFERT, H. et al. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. **Zentralbl Bakteri**, v.279, n.4, n.9, p.544–552, 1993.

SEIFERT, H.; GERNER-SMIDT, P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. **J Clin Microbiol**, v.33, n.5, p.1402-1407, 1995.

SEROTA, D.P. et al. Severe Community-Acquired Pneumonia due to *Acinetobacter baumannii* in North America: Case Report and Review of the Literature. **Open Forum Infect Dis**, v.5, n.3, p.ofy044, 2018.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v.42, n.1, p.1–7, 2014.

SHENG, W.H. et al. A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Int J Infect Dis**, v.14, n.9, e764–e769, 2010.

SKIADA, A. et al. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**, v.37, n.3, p.187–193, 2011.

SMITH, M.G.; DES ETAGES, S.G.; SNYDER, M. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. **Mol Cell Biol**, v.24, n.9, p.3874-3884, 2004.

SOUSA, J.C. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Mol Microbiol**, v. 52, n.4, p.917-924, 2004.

STEFANIUK, E.M; TYSKI, S. Colistin Resistance in Enterobacterales Strains – A Current View. **Pol J Microbiol**, v.68, n.4 ,p.417–427, 2019.

STEIN, G.E. et al. Tigecycline: an update, **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.75, p.331-336, 2013.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v.40, n.2, p.175-179, 2000.

STRATEVA, T. et al. Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. **Braz J Infect Dis**, v.16, n.3, p.307–310, 2012.

SU, X.Z. et al. An H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.10, p.4362–4364, 2005.

SUN, J. et al. Towards understanding MCR-like colistin resistance. **Trends Microbiol**, v.26, p.30042–30048, 2018.

SUNENSHINE, R.H. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. **Emerg Infect Dis**, v.13, n.1, p.97-103, 2007.

- SUNG, J.Y. et al. AbaR7, a genomic resistance island found in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Daejeon, Korea. **Ann Lab Med**, v.32, n.5, p.324-330, 2012.
- TACCONE, F.S. et al. Successful treatment of septic shock due to pan-resistant *Acinetobacter baumannii* using combined antimicrobial therapy including tigecycline. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.25, n.4, p.257-260, 2006.
- TADA, T. et al. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. **BMC Infect Dis**, v.13, p.251–256, 2013.
- TAITT, C.R. et al. Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n2, p.767-781, 2014.
- TAL-JASPER, R. et al. Clinical and Epidemiological Significance of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, n.5, p.3127–3131, 2016.
- TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.
- TETZ, V.V.; TETZ, G.V. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. **DNA Cell Biol**, v.29, n.8, p.399-405, 2010.
- THOMAS, V.C. et al. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v.72, n.4, p.1022–1036, 2009.
- TOGNIM, M.C. et al. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Infect Dis**, v.8, n.5, p.284–291, 2004.
- 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, p.3473–3484, 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, p.3398-3409, 2008.
- TOMASCHEK, F. et al.. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. **PLoS One**, v.11, n.4, e0153014, 2016.
- TOUCHON, M. et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome Biol Evol**, v.6, p.2866–2882, 2014.

- TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **J Hosp Infect**, v.73, n.4, p.355-363, 2009.
- TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R.O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **Am J Infect Control**, v.32, n.3, p.177-183, 2004.
- TROTTIER, V. et al. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. **J Burn Care Res**, v.28, n.2, p.248-254, 2007.
- TURNER, P.J.; GREENHALGH, J.M. The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. **Clin Microbiol Infect**, v.9, n.6, p.563-567, 2003.
- TURTON, J. F. et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v.258, p.72-77, 2006.
- VAKULENKO, S. B.; MOBASHER, Y. S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n.3, p.430-450, 2003.
- VALENCIA, R. ET al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.30, n.3, p.257-263, 2009.
- VALENTINE, S.C. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. **J Clin Microbiol**, v.46, n.8, p.2499-5207, 2008.
- VAN DESSEL, H. et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. **Res Microbiol**, v.155, n.2, p.105-112, 2004.
- VASCONCELOS, A.T. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.83, n.4, p.382-38, 2015.
- VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends Microbiol**, v.16, n.10, p.496-506, 2008.
- VIEHMAN, J.A.; NGUYEN, M.H.; DOI, Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Drugs**, v.74, n.12, p.1315-1333, 2014.
- VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future Sci OA**, v.5, n.6, FSO395, 2019.
- VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future Sci OA**, v.5, n.6, FSO395, 2019.
- VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother**, v.59, n.6, p.1210-1215, 2007.

VILLEGAS, M.V; HARTSTEIN, A.I. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.24, n.4, p.284-295, 2003.

VOURLI, S. et al. Synergistic interactions between colistin and meropenem against extensively drug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ICU patients. **Int J Antimicrob Agents**, v.45, n.6, p.670-671, 2015.

WACHINO, J; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resist Updat**, v.15, n.3, p.133-48, 2012

WANG, J. et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. **PLoS One**, v.9, n.8, e104882, 2014.

WANG, X.; PRESTON, J.F. 3rd, ROMEO, T. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **J Bacteriol**, v.186, n.9, p.2724-2734, 2004.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, v.39, n.3, p.309-317, 2004.

WISPLINGHOFF, H.; PERBIX, W.; SEIFERT, H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. **Clin Infect Dis**, v.28, n.1, p.59-66, 1999.

WONG, D. et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. **Clin Microbiol Rev**, v.30, n.1, p.409–447, 2017.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Inter J Antimicrob Agent**, v.27, n.4, p.351-353, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. Acesso em: 20 fev 2020.

WRIGHT, G. D.; THOMPSON, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. **Front Biosci**, v.4, p.9–21, 1999.

WRIGHT, M.S. et al. Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. **Genome Med**, v.8, p.26, 2016.

XIE, R. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n.3, 2018

YAMADA, Y.; SUWABE, A. Diverse carbapenem-resistance mechanisms in 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii*. **J Med Microbiol**, v.62, p.618–622, 2013.

YANG, S. et al. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Appl. Environ. Microbiol**, v.73, n.4, p.1079–1088, 2007.

YAU, W. et al. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Infect**, v.58, n.2, p.138–144, 2009.

ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents**, v.41, n.1, p.11-19, 2013.

ZAVASCKI, A.P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n.6, p.1206–1215, 2007.

ZHENG, Y.L. et al. Risk factors and mortality of patients with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. **Am J Infect Control**, v.41:, p.e1–5, 2013.

ZHOU, Y. et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.29, n.11, p.1349-1353, 2010.

APÊNDICE A - Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, origem, sítio de coleta, tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), da avaliação da heterorresistência e do biofilme (continua).

Cepas	Origem	Sítio de coleta	Pulsotipos	HR	Biofilme
1SAN	Hospital 1	Urina	H	S	Moderado
2SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	M	-	Moderado
3SAN	Hospital 1	Não identificado	A	N	Não aderente
4SAN	Hospital 1	Sangue	G	-	Não aderente
13SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	E	-	Moderado
14SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	S	Moderado
15SAN	Hospital 1	Ferida	A	-	Fraco
19SAN	Hospital 1	Ferida	F	N	Fraco
20SAN	Hospital 1	Lavado broncoalveolar	A	-	Moderado
21SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	N	Forte
23SAN	Hospital 1	Ferida	F	N	Forte
24SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	N	Forte
26SAN	Hospital 1	Lavado broncoalveolar	A	S	Moderado
28SAN	Hospital 1	Lavado broncoalveolar	F	N	Moderado
31SAN	Hospital 1	Sangue	A	N	Forte
34SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	C	N	Moderado
35SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	C	S	Moderado
40 SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	E	S	Forte
41SAN	Hospital 1	Sangue	A	N	Forte
42SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	S	Forte
44SAN	Hospital 1	Sangue	A	-	Forte
47SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Moderado
49SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	C	S	Moderado
50SAN	Hospital 1	Lavado broncoalveolar	C	N	Moderado

APÊNDICE A - Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, origem, sítio de coleta, tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), da avaliação da heterorresistência e do biofilme (continuação).

Cepas	Origem	Sítio de coleta	Pulsotipos	HR	Biofilme
52SAN	Hospital 1	Ferida	J	S	Forte
55SAN	Hospital 1	Sangue	B	N	Moderado
56SAN	Hospital 1	Sangue	B	N	Não aderente
57SAN	Hospital 1	Sangue	C	N	Moderado
58SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Fraco
59SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	N	Moderado
60SAN	Hospital 1	Ferida	A	N	Forte
61SAN	Hospital 1	Urina	A	N	Forte
62SAN	Hospital 1	Urina	B	N	Forte
63SAN	Hospital 1	Não identificado	N	-	Não aderente
67SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	-	Não aderente
68SAN	Hospital 1	Cateter	C	S	Moderado
69SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	A	N	Forte
70SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	D	S	Forte
71SAN	Hospital 1	Aspirado brônquico	L	S	Não aderente
73SAN	Hospital 2	Cateter	A	S	Fraco
74SAN	Hospital 2	Aspirado traqueal	D	S	Moderado
78SAN	Hospital 2	Aspirado traqueal	D	S	Moderado
88SAN	Hospital 2	Ferida	E	-	Moderado
89SAN	Hospital 2	Swab retal	J	N	Moderado
91SAN	Hospital 2	Swab retal	D	N	Moderado
92SAN	Hospital 2	Swab retal	D	S	Forte
93SAN	Hospital 2	Urina	A	N	Fraco
94SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Fraco
95SAN	Hospital 1	Ferida	B	-	Moderado
96SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	I	S	Moderado

APÊNDICE A - Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, origem, sítio de coleta, tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), da avaliação da heterorresistência e do biofilme (conclusão).

Cepas	Origem	Sítio de coleta	Pulsotipos	HR	Biofilme
97SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Não aderente
98SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Não aderente
100SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	-	Forte
104SAN	Hospital 2	Não identificado	D	N	Fraco
106SAN	Hospital 2	Sangue	A	N	Não aderente
107SAN	Hospital 2	Swab retal	E	N	Fraco
115SAN	Hospital 2	Swab retal	G	N	Moderado
118SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	C	-	Moderado
119SAN	Hospital 1	Urina	O	N	Forte
120SAN	Hospital 1	Não identificado	C	N	Moderado
123SAN	Hospital 1	Urina	I	N	Moderado
124SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Não aderente
125SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	C	N	Não aderente
126SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	B	N	Fraco
130SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	K	S	Não aderente
131SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	E	-	Não aderente
132SAN	Hospital 1	Urina	G	-	Fraco
135SAN	Hospital 1	Urina	G	S	Fraco
136SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	K	S	Fraco
138SAN	Hospital 1	Urina	H	S	Fraco
142SAN	Hospital 1	Aspirado traqueal	H	N	Moderado
181SAN	Hospital 1	Urina	F	S	Moderado

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: HR, heterorresistência, S, sim, N, não.

APÊNDICE B – Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, resultados do antibiograma e da pesquisa de *bla_{OXA}* e da associação de *ISAbal* e *bla_{OXA-23}* (continua).

Cepas	CN	SAM	STX	CTX	CAZ	FEP	CIP	MIO	IPM	MEM	PB	Classificação	<i>oxa-51</i>	<i>oxa-23</i>	<i>oxa-24</i>	<i>ISAbal</i> ⁺ <i>oxa-23</i>
1SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
2SAN	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	N-MDR	+	+	+	+
3SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
4SAN	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	N-MDR	+	+	-	+
13SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
14SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
15SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
19SAN	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
20SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
21SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
23SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
24SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
26SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
28SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
31SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
34SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
35SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
40 SAN	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	MDR	+	+	-	-
41SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
42SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
44SAN	R	S	R	R	I	I	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
47SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
49SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
50SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+

APÊNDICE B – Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, resultados do antibiograma e da pesquisa de *bla*_{OXA} e da associação de *ISAbal* e *bla*_{OXA-23} (continuação).

Cepas	CN	SAM	STX	CTX	CAZ	FEP	CIP	MIO	IPM	MEM	PB	Classificação	<i>oxa-51</i>	<i>oxa-23</i>	<i>oxa-24</i>	<i>ISAbal+oxa-23</i>
52SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
55SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
56SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
57SAN	R	I	I	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
58SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
59SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
60SAN	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
61SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
62SAN	I	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
63SAN	I	I	R	I	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
67SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	MDR	+	+	-	+
68SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
69SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
70SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
71SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
73SAN	S	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
74SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
78SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	-
88SAN	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
89SAN	S	S	R	R	R	I	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
91SAN	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
92SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
93SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
94SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
95SAN	R	R	R	I	I	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
96SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+

APÊNDICE B – Tabela das cepas incluídas no estudo com o número da cepa, resultados do antibiograma e da pesquisa de *bla_{OXA}* e da associação de *ISAbal* e *bla_{OXA-23}* (conclusão).

Cepas	CN	SAM	STX	CTX	CAZ	FEP	CIP	MIO	IPM	MEM	PB	Classificação	<i>oxa-51</i>	<i>oxa-23</i>	<i>oxa-24</i>	<i>ISAbal1+</i> <i>oxa-23</i>
97SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
98SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
100SAN	R	R	I	R	I	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
104SAN	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
106SAN	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
107SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
115SAN	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
118SAN	R	I	I	R	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
119SAN	S	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	MDR	+	+	-	-
120SAN	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
123SAN	R	I	R	R	S	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
124SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
125SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
126SAN	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
130SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
131SAN	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
132SAN	S	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	XDR	+	+	-	+
135SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
136SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	XDR	+	+	-	+
138SAN	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
142SAN	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+
181SAN	S	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	MDR	+	+	-	+

Fonte: (GENTELUCI, 2020).

Legenda: AK, amicacina; CN, gentamicina, SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam, STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CTX, cefotaxima, CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima, CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MER, meropenem; MIO, minociclina; PB, polimixina B; S, suscetível, I, resistência intermediária, R, resistente, n-MDR, não multirresistente, MDR, multirresistente, XDR, extensivamente resistente; +, positivo, - negativo. *As cepas que apresentaram resistência intermediária foram considerados resistentes.



Polymyxin B Heteroresistance and Adaptive Resistance in Multidrug- and Extremely Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Gabrielle Limeira Genteluci^{1,2} · Paula Araujo de Souza¹ · Daniela Betzler Cardoso Gomes^{1,2} · Verônica Santos Sousa¹ · Maria José de Souza³ · José Roberto Lannes Abib⁴ · Eduardo Almeida Ribeiro de Castro⁵ · Karyne Rangel⁶ · Maria Helena Simões Villas Bôas¹

Received: 19 December 2019 / Accepted: 29 May 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Acinetobacter baumannii is an emerging pathogen associated with nosocomial infections and multidrug resistance. Polymyxin B has been used to treat infections caused by multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* but an increase in polymyxin B resistance has been observed. We aimed to determine the diversity, antimicrobial susceptibility, presence of polymyxin B heteroresistance and adaptive resistance in 72 *A. baumannii* clinical isolates from two public hospitals in Rio de Janeiro. The isolates were identified by sequencing of *rpoB* gene. Determination of the genetic diversity of isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis and oxacillinases genes were detected by polymerase chain reaction. The polymyxin B heteroresistance was analyzed by population analysis profile and adaptive resistance was evaluated after serial daily passages of isolates in broth containing increasing polymyxin B concentrations. The results showed that 49% of the isolates were collected from respiratory system and 62% were MDR, while 35% were extensively drug resistant. Additionally, all the isolates carried *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} genes and *ISAbal1*, while 1% had *bla*_{OXA-24-like} gene. The association of *ISAbal1*-*bla*_{OXA-23} was found in 96% of the isolates. Polymyxin B heteroresistance was found in 36% of the isolates and polymyxin B adaptive resistance was not found in the isolates. Our study demonstrated the high resistance to antimicrobials used in clinical practice and the spread of oxacillinases genes and insertion sequence (IS). We also reported the presence of heteroresistance to polymyxin B used as a last-resort therapy for MDR *A. baumannii*.

Introduction

Resistance to almost all antimicrobials in *Acinetobacter baumannii* is a critical challenge. The number of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii* has been increasing globally and it is now

regarded as one of the most difficult nosocomially acquired Gram-negative pathogens to treat and control [1, 2]. Intrinsic and acquired resistance limits therapeutic options for serious infections caused by this pathogen [3].

One of the few antimicrobial classes to which MDR *A. baumannii* retains susceptibility are the polymyxins [4, 5]. Polymyxin is a bactericidal antimicrobial that disrupts the cell membrane. Positively charged regions of the polymyxin bind to negatively charged hydrophilic portions (lipid A) of lipopolysaccharides present on outer membrane, resulting in cell death [6]. Polymyxin E (colistin) and B demonstrate favorable properties against MDR *A. baumannii*, although there are concerns about the development of nephrotoxicity and neurotoxicity [7, 8].

Heteroresistance is defined as antimicrobial resistance expressed by a subset of a microbial population that is considered susceptible to an antibiotic by standard testing methodology [9]. This phenomenon can complicate the assessment of minimum inhibitory concentration (MIC) and promote resistance to polymyxins in vivo [10]. The

✉ Gabrielle Limeira Genteluci
genteluci2@hotmail.com

¹ Department of Microbiology, National Institute of Quality Control in Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Post-Graduation Program in Health Surveillance, National Institute of Quality Control in Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

³ Federal Hospital of State Servers, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Bonsucesso Federal Hospital, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Piedade Municipal Hospital, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Center for Technological Development in Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

mechanism of polymyxin heteroresistance in *A. baumannii* was attributed to a loss of lipopolysaccharide production in subpopulations showing high-level resistance [11]. Studies have reported a varied rate of polymyxin heteroresistance in *A. baumannii*, ranging from 0 to 100% [12–15].

Adaptive resistance is known to emerge when populations of bacteria are subjected to gradual increases in antimicrobials. The non-resistant phenotype reverses when the antimicrobials are removed from the medium [16]. Barin et al. [15] revealed that a high level of polymyxin B adaptive resistance in *A. baumannii* is very frequent.

Reports have demonstrated the emergence of heteroresistance to polymyxin in *A. baumannii*, which can complicate the assessment of MICs and promote resistance to polymyxin. The presence of adaptive resistance to polymyxins is demonstrated in other bacteria, mainly in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [17, 18].

The objective of this report was to determine the diversity, antimicrobial susceptibility, presence of heteroresistance and adaptive resistance to polymyxin in MDR and XDR isolates of *A. baumannii*.

Methods

Bacterial isolates

A total of 72 *A. baumannii* isolates were obtained in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, between 2014 and 2015. The isolates were identified by Vitek 2 automated system (BioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO, CA) and species-specific *rpoB* gene-based PCR to the species level as previously described [19]. The obtained sequences of the *rpoB* region of each isolate were aligned with the published *rpoB* region sequences of *A. baumannii* isolates from GenBank database.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

The preparation of genomic DNA of *A. baumannii* isolates was done as described by Pulsenet [20], with some modifications. The chromosomal DNA of the isolates was digested with 10U *Apa* I at 30 °C for 2 h. PFGE was performed by using a CHEF-DR III system (Bio-Rad Laboratories) and the conditions employed were as follows: initial switch time of 5 s; final switch time of 15 s; angle of 120 °C; gradient of 6 V/cm; and run time of 18 h at 14 °C. The PFGE patterns were interpreted based on the criteria of Tenover et al. [21] and by Bionumerics software version 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). A cluster cut-off similarity value of 85% was considered to delineate epidemiological unrelated isolates [22].

Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion for all isolates against ampicillin–sulbactam, piperacillin–tazobactam, trimethoprim–sulfamethoxazole, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, and minocycline. The susceptibility to polymyxin B was determined using MIC by broth dilution method [23]. Isolates were classified as XDR or MDR, according Magiorakos et al. [24].

Detection of antimicrobial-resistant genes and IS*Aba1* element

PCR reactions for *mcr-1* were done in singleplex [25] and for oxacillinase genes (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143}) in multiplex PCR as reported in Woodford et al. [26]. The isolates were screened for the presence of IS*Aba1* element [27] and analyzed for the potential expression of the *bla*_{OXA-23} gene by investigating the presence of the IS*Aba1* element upstream of the gene [28, 29]. Target genes and their corresponding primers for PCR amplification are mentioned in Table 1.

Sequencing technique

The PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Axygen, Corning). The direct sequencing of the amplicons was performed by the Sequencing Platform of the Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation. The nucleotide sequences were analyzed using SeqMan software and basic local alignment search tool (BLAST) in the national center for biotechnology information (NCBI).

Population analysis profile (PAP)

Polymyxin B heteroresistance was analyzed by PAP in a total of 58/72 isolates. Isolates were tested in duplicate through serial dilutions using a 0.5 McFarland standard inoculum on Mueller–Hinton agar plates containing increasing concentrations of polymyxin B (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 6.0 µg/mL) [15]. Heteroresistance was determined by growth of *A. baumannii* colonies on plates containing at least twofold dilutions higher than the original population [15]. The PAP frequency of heteroresistance was defined as the ratio of the number of colony-forming units on the plate with the highest concentration of polymyxin B in relation to the control plate (with no antibiotic) [14]. Colonies that grew at the highest

Table 1 Primer sequences and amplicon sizes

Target	Genes	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)/References
Colistin resistant	<i>mcr-1</i>	F-CGG TCA GTC CGT TTG TTC	1626 bp [25]
		R-CTT GGT CGG TCT GTA GGG	
Oxacillinases	<i>bla</i> _{OXA-23}	F-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501 bp [26]
		R-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
	<i>bla</i> _{OXA-24}	R-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	249 bp [26]
		F-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
	<i>bla</i> _{OXA-51}	R-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353 bp [26]
		F-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
<i>bla</i> _{OXA-58}	F-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599 bp [26]	
	R-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC		
<i>bla</i> _{OXA-143}	F-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT	± 150 bp [26]	
	R-TAA TCC TGA GGG GGC CAA CC		
IS element	<i>ISAbal</i>	F-ATG CAG CGC TTC TTT GCA GG	390 bp [27]
		R-AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG	
	<i>ISAbal—bla</i> _{OXA-23}	F- AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG	1456 bp [28, 29]
R- TCA CAAC AAC TAA AAG CAC T			

IS insertion sequence

concentrations of polymyxin B were passed for determination of polymyxin B MICs.

Adaptive resistance

The same isolates ($n = 58$) of heteroresistance analysis were selected for polymyxin B adaptive resistance analysis. The isolate inoculums were obtained using a 0.5 McFarland standard and submitted to serial daily passages on Mueller–Hinton agar plates containing increasing polymyxin B concentrations of 0.25 to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for a total of nine days [15, 17]. Colonies that grew at the highest concentrations of polymyxin B were passed for determination of polymyxin B MICs.

Results

Characterization of isolates

A total of 72 isolates were recovered from patients from two hospitals in the city of Rio de Janeiro and were identified as *A. baumannii* using *rpoB* sequencing. The *A. baumannii* isolates were mainly collected from respiratory system (49%, includes isolates from bronchial aspirate, bronchoalveolar lavage, and tracheal aspirate) and urine (14%), with the remaining isolates coming from blood (11%), wound (10%), rectal biopsy (7%), catheter (3%) and the collected source was not identified in 6% of isolates. PFGE analysis of the 72 *ApaI*-digested *A. baumannii* isolates produced 15 different PFGE profiles, with a cut-off of 85% genetic similarity. The PFGE patterns were classified in pulsotypes A to O (Fig. 1).

Antimicrobial susceptibility

The susceptibility to antimicrobials varied: high level of resistance to cephalosporins (99–83%), trimethoprim–sulfamethoxazole, ciprofloxacin and carbapenems (96%), piperacillin–tazobactam (93%) and ampicillin/sulbactam (90%), and low level of resistance to gentamicin (64%), amikacin (53%). Minocycline was found to be the most effective antimicrobial against *A. baumannii* isolates, with a 100% susceptibility rate being reported. Fourteen (19%) isolates were resistant to polymyxin B, the MIC values ranged between 4 and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Furthermore, 62% ($n = 45$) of isolates showed MDR phenotype and 35% ($n = 25$) XDR phenotype.

Detection of carbapenem-resistant and colistin-resistant genes and IS element

Using PCR assay, all isolates were positive for *bla*_{OXA-23}-like and *bla*_{OXA-51}-like genes and one tested positive for *bla*_{OXA-24}-like. None of the isolates were positive for *bla*_{OXA-58}-like, *bla*_{OXA-143}-like and *mcr-1* gene. In addition, all 72 isolates carried the *ISAbal* element. Of these, 69 (96%) had the IS element upstream of the *bla*_{OXA-23} gene. The sequencing of the PCR products showed conserved regions for the *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-24}-like, *bla*_{OXA-51}-like, *ISAbal* genes, and *ISAbal—bla*_{OXA-23}, which were confirmed with BLAST in NCBI.

Population analysis profile

The overall incidence of polymyxin B heteroresistance among *A. baumannii* polymyxin B-susceptible isolates was

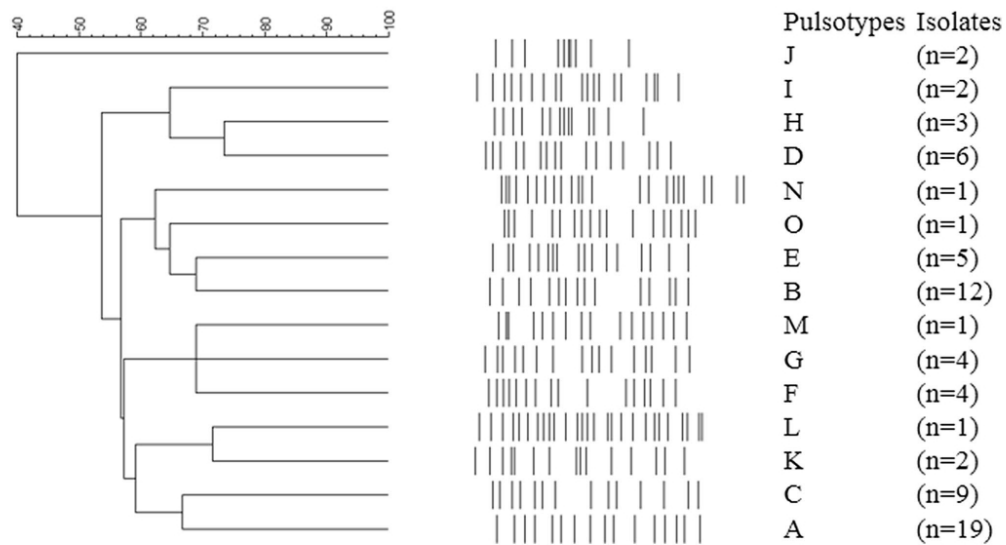


Fig. 1 PFGE dendrogram of 72 *A. baumannii* clinical isolates clustered using Bionumerics 4.0 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)

21 (36%). Among *A. baumannii* respiratory isolates, heteroresistance was demonstrated in 13/21 (63%), among urine isolates in 4/21 (19%), catheter in 2/21 (9%), rectal biopsy and wound in one isolate each (4.5%). The PAP frequency of heteroresistance subpopulations ranged from 0.3×10^{-7} to 0.4×10^{-4} . Ten MICs of polymyxin B of the heteroresistant colonies remained higher than the original population MIC, four remained the same MIC than the original population, and seven demonstrated lower MIC than the original population (Table 2). The 58 isolates were also assessed for adaptive resistance, but no isolate has grown at polymyxin B concentrations higher than 2 $\mu\text{g/mL}$.

Discussion

In our study, we investigated the diversity and the presence of heteroresistance and adaptive resistance to polymyxin B in multidrug-resistant and extremely resistant clinical *A. baumannii*. The 72 *A. baumannii* isolates were collected from six different sources. The higher isolation rates of *Acinetobacter* from the respiratory system are in agreement with the results reported previously in Brazil and other countries [30–32].

Genotypic analysis of *A. baumannii* isolates identified 15 PFGE patterns and the most predominant clones were A and B, which suggests high clonal relatedness [33]. However,

MDR, XDR and heteroresistant polymyxin B *A. baumannii* isolates were not clonally related.

The high resistance rates of *A. baumannii* isolates against most of antimicrobials tested have been reported [34, 35]. Although carbapenems are considered the antimicrobial of choice for the treatment of *A. baumannii* infections, we observed an increase in the resistance to this antimicrobial class, which highlights the need to find new and alternative therapeutic approaches [5, 36].

We reported 62% of isolates as MDR and 35% as extensively drug resistant. Worldwide, the antibiotic resistance profiles of *A. baumannii* isolates are similar, which causes great concern considering the lack of treatment options for dealing with MDR *A. baumannii* infections [5].

Therefore, the current treatment options include at least one or two classes of agents, among them, polymyxins [5]. Polymyxins remain the treatment option for the management of most cases of infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii* isolates. We found resistance to polymyxins B among 19% of the isolates, which is in accordance with the previous studies. The emergence of *Acinetobacter* resistance against polymyxins is reported with increasing frequency [34, 37].

The *bla*_{OXA-23} gene is considered a virulence biomarker and a significant cause of carbapenem resistance worldwide. It is either located on the chromosome or on plasmids [38]. In our study, *bla*_{OXA-23-like} was also the most common

Table 2 Pulsotype, resistance, and population analysis profiles of polymyxin B heteroresistant isolates

Pulsotype	Source	Resistance profile	Original PB MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HR PB MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PAP frequency	HR colonies PB MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A	Respiratory	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0.4×10^{-4}	2
	Respiratory	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0.4×10^{-6}	8
	Respiratory	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2.0×10^{-6}	1
	Catheter	AK, SAM, TZP, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1.0×10^{-6}	0.25
C	Respiratory	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1.8×10^{-6}	2
	Respiratory	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2.0×10^{-6}	16
	Catheter	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0.4×10^{-6}	1
D	Respiratory	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1.4×10^{-6}	0.5
	Respiratory	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1.7×10^{-6}	1
	Respiratory	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0.7×10^{-6}	8
	Rectal biopsy	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	3	2.4×10^{-6}	2
E	Respiratory	CN, SAM, TZP, STX, CTX	2	6	2.0×10^{-6}	0.5
F	Urine	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	0.7×10^{-6}	0.25
G	Urine	AK, SAM, TZP, STX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0.3×10^{-7}	4
H	Urine	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1.2×10^{-6}	4
	Urine	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2.2×10^{-6}	0.125
I	Respiratory	CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	2.0×10^{-6}	2
J	Wound	SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1.2×10^{-6}	1
K	Respiratory	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	2	6	1.3×10^{-6}	2
	Respiratory	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	0.3×10^{-6}	1
L	Respiratory	AK, CN, SAM, TZP, STX, CTX, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER	1	6	1.3×10^{-6}	4

AK amikacin, GEN gentamicin, SAM ampicillin/sulbactam, TZP piperacillin/tazobactam, STX trimethoprim-sulfamethoxazole, CTX cefotaxime, CAZ ceftazidime, FEP cefepime, CIP ciprofloxacin, IMP imipenem, MER meropenem, in accordance with CLSI

MIC, minimal inhibitory concentration, PB polymyxin B, PAP population analysis profile, HR heteroresistant to polymyxin B, HR PB MIC MIC of isolates that was considered HR, HR colonies, PB MIC MIC of HR colonies that was determined in population analysis profile (PAP)

oxacillinase gene identified, similar to other studies [39, 40]. Our results show that there was a strong correlation between the presence of *bla*_{OXA-23-like} and *ISAbal*. Two of three isolates that did not have *ISAbal*-*bla*_{OXA-23} were susceptible to carbapenems. The *bla*_{OXA-24} gene was also detected, but in only one isolate [35, 39].

The presence of polymyxin B heteroresistance was shown in 36% of 58 isolates tested (present in 11 of 15 clones), in contrast, the presence of polymyxin B adaptive resistance was not shown, differently from a previous study with Brazilian isolates [15]. However, a high colistin-heteroresistance was demonstrated in other studies [12–14, 41].

All polymyxin B heteroresistant isolates were classified as MDR or XDR. Some MICs of these subpopulations presented 2- to at least 4-fold dilutions higher than the original population. Moreover, the majority of *A. baumannii* respiratory isolates demonstrated polymyxin B heteroresistance [41]. Finally, it is important to note that none of the predominant clone B isolates presented polymyxin B heteroresistance.

- standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(5):268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
25. Liu YY, Wang Y, Walsh TR et al (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
 26. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agent* 27:351–353
 27. Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P (2009) Functional analysis of insertion sequence ISAbal, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 191:2414–2418. <https://doi.org/10.1128/JB.01258-08>
 28. Segal H, Garny S, Elisha BG (2005) Is ISAbal-1 customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 243:425–429
 29. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM (2001) Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:583–588
 30. Huang J, Chen EZ, Qu HP et al (2013) 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)* 26:1826–1831
 31. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT et al (2015) Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13:567–573. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1025055>
 32. de Azevedo FKSF, Dutra V, Nakazato L et al (2019) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. *J Med Microbiol* 68:31–40. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000853>
 33. Duarte A, Ferreira S, Almeida S et al (2016) Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 45:29–33. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.02.002>
 34. Genteluci GL, Gomes DBC, Souza MJ et al (2016) Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. *J Bras Patol Med Lab* 52:91–95. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160021>
 35. Brasiliense D, Cayó R, Streling AP et al (2019) Diversity of metallo- β -lactamase-encoding genes found in distinct species of *Acinetobacter* isolated from the Brazilian Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 114:e190020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190020>
 36. Tal-Jasper R, Katz DE, Amrami N, Ravid D et al (2016) Clinical and epidemiological significance of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3127–3131. <https://doi.org/10.1128/AAC.02656-15>
 37. Lenhard JR, Thamlikitkul V, Silveira FP et al (2017) Polymyxin-resistant, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is eradicated by a triple combination of agents that lack individual activity. *J Antimicrob Chemother* 72:1415–1420. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx002>
 38. Luo TL, Rickard AH, Srinivasan U et al (2015) Association of *blaOXA-23* and *bap* with the persistence of *Acinetobacter baumannii* within a major healthcare system. *Front Microbiol* 6:182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00182>
 39. Opazo A, Domínguez M, Bello H et al (2012) OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* 6:311–316
 40. Neves FC, Clemente WT, Lincopan N et al (2016) Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. *Braz J Infect Dis* 20:556–563. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.004>
 41. Srinivasa P, Hunt LN, Pouch SM et al (2018) Detection of colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* from blood and respiratory isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 91:194–198. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.028>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.