



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos

CARMELITA DE LIMA BEZERRA CAVALCANTI

Recife
2017

CARMELITA DE LIMA BEZERRA CAVALCANTI



Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Dyana Leal Veras

Recife

2017

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C376t Cavalcanti, Carmelita de Lima Bezerra.
Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos / Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti. – 2017.
108 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Virulência. 3. Expressão gênica. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-100)

CARMELITA DELIMA BEZERRA CAVALCANTI

Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Fábio André Brayner dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa
LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira
LINAT/Universidade Federal de Pernambuco

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINATROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Celina Maria Turchi Martelli

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fabio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Virgínia Maria Barros de Lorena

Vláudia Maria Assis Costa

Dedico este trabalho às pessoas que são o amor, a compreensão e a alegria que preciso para ser feliz, Fernanda, Mariana, Paula e Emanuel.

“O triunfo não é completo desfrutado solitariamente.”

Teo Cortés

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por toda paz e harmonia que encontro na fé;
- Aos meus orientadores, Fabio Brayner e Luiz Carlos Alves, pela inestimada acolhida, apoio, ensinamentos, confiança nessa jornada e nossa longa amizade familiar;
- À minha Co-orientadora Dyana Leal Veras por todos os ensinamentos, dedicação desde a elaboração do projeto até a sua conclusão, e pela consolidação de uma amizade verdadeira;
- A todos que compõem o programa de Medicina Tropical pelo suporte e pela oportunidade de aprendizado;
- Ao prof. José Luiz de Lima Filho, por todo o apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho;
- A todos que compõem os laboratórios parceiros: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, ao ProspeqMol - LIKA, ao Laboratório de Biologia Molecular - LIKA, ao Laboratório Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz, em especial à Dra Cássia Docena pelo suporte técnico e disponibilidade, ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco e ao laboratório ALERTA, São Paulo-SP pela imensurável contribuição na execução do trabalho e na parceria;
- A Ana Carolina Ramos, do Laboratório Alerta, pelos ensinamentos de técnicas de tipagem e carinhosa acolhida;
- A Ana Paula Sampaio, pela eterna disposição e generosidade nos ensinamentos, pelo exemplo de profissional e pela amizade que construímos;
- A Eduarda Manguiera, pelo companheirismo em todas as horas, pelo apoio incondicional e por fazer parte da minha vida pra sempre;
- A Wagner Oliveira, pela bondade de contribuir com ensinamentos e dedicação de forma tão altruísta;
- A toda família do LBCM: Alberon Araújo, Amanda Aliança, Amanda Vasconcelos, Anntonio Sérgio, Camila Queiroz, Catarina Fernandes, Cristiane

Brito, Elverson Melo, Everton Moraes, Fernanda Lima, Gabriel Gazzoni, Iany França, Jefferson Albuquerque, Jana Sandes, Jorge Belém, Josenil Soares, Josué Araújo, Karla Ribeiro, Marina Cartaxo, Nairomberg Portela, Olavio Campos, Paula Roberta, Rafael Padilha, Renata, Rubens Rocha, Sophia Dantas, Thaynara Millena, Tibério César, pela companhia sempre agradável, pelas deliciosas gargalhadas, pela divisão das tarefas e por todo carinho e dedicação recebidos;

- A Alisson Rocha, meu primeiro estagiário, muito dedicado e aplicado em suas tarefas;
- A toda turma do LIKA, pela convivência de todos esses anos com muito carinho e amizade;
- Ao Sr. Nelson, Rita e Edson, do setor de Esterilização do CPqAM, pelo apoio na etapa de preparação dos experimentos;
- A Rodrigo Costa, por estar sempre presente com todo seu carinho;
- A todos os meus tios e tias por serem exemplo na minha formação e pela generosidade e atenção sempre;
- Aos meus primos: Carlinhos e Jorge, pela amizade sincera e apoio incondicional;
- Ao meu irmão, Paulo, e sua família, por todo o apoio e a presença de sempre com muito amor e carinho;
- À minha mãe, Ione, por todo amor e orações diárias;
- Às minhas filhas: Fernanda, Mariana e Paula pela oportunidade de conviver com seres lindos, cheios de amor e minhas companheiras sempre;
- Ao meu esposo, Emanuel, por estar sempre ao meu lado, ser meu porto seguro e minha inspiração.

RESUMO

Apesar do grande envolvimento de isolados de *Acinetobacter baumannii* em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e do seu alto índice de multidroga-resistência, levando a poucas opções terapêuticas em casos de infecções causadas por esta espécie bacteriana, há muito a ser descoberto sobre os mecanismos de virulência e resistência desta espécie. Portanto, este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil clonal, de resistência e virulência de isolados multidroga-resistentes (MDRs) de *A. baumannii* obtidos em hospitais de Recife-PE, determinando a prevalência de genes de resistência e virulência e a capacidade de expressão de genes de virulência após submissão dos isolados a diferentes antimicrobianos utilizados na prática clínica. Para determinar a prevalência dos genes de resistência e virulência foram utilizados 37 isolados do complexo *A. baumannii* provenientes de dois hospitais públicos de Recife – PE. A análise da expressão dos genes de virulência foi realizada utilizando três isolados MDR selecionados, além da ATCC 19606 de *A. baumannii* submetidos *in vitro* a colistina, meropenem e associação destes antimicrobianos. Os isolados foram avaliados quanto à confirmação da espécie através da detecção do gene *bla*_{OXA-51-like} e da técnica de MALDI-TOF. A tipagem molecular desses isolados foi realizada através da técnica de PFGE utilizando a enzima de restrição *Apa*1. A detecção e sequência dos genes de resistência, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, o elemento de inserção, *ISAba1*, e dos genes de virulência, *basC*, *ompA*, *pilA* e *csuE* foi realizada através de PCR e sequenciamento gênico. Todos os isolados pertenciam à espécie *A. baumannii*, distribuídos em 07 padrões de PFGE, com três isolados apresentando 100% de similaridade, os quais foram obtidos nos dois hospitais públicos do estudo, sugerindo uma disseminação inter-hospitalar. Todos os isolados apresentaram o gene de resistência *bla*_{OXA-51-like} e a maioria possuía o gene *ISAba1*, além desses, também apresentavam o gene *bla*_{OXA-143-like} ou *bla*_{OXA-23-like}. Estes resultados demonstram uma ampla resistência dos isolados aos carbapenêmicos, além de outras classes de antimicrobianos. Os dados são preocupantes quanto à disseminação clonal desses genes entre os isolados obtidos nos hospitais analisados. Todos os isolados do estudo apresentaram os genes de virulência *basC*, *ompA*, *pilA* e *csuE*, com exceção de um isolado que não apresentou o gene *csuE*. Também pode-se demonstrar uma tendência ao aumento da expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS* e *baeS* após tratamento *in vitro* com meropenem, colistina e associação destes antimicrobianos, reforçando a necessidade de vigilância quanto ao tratamento de IRAS causadas por *A. baumannii* MDR, mesmo em uso associado de antimicrobianos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Virulência. Expressão gênica.

ABSTRACT

Due to the increasing resistance of clinical isolates of *A. baumannii* to antimicrobial and the consequent decrease of effective therapeutic options, this study aimed to establish the clonal profile, resistance and virulence of *A. baumannii* multidrug-resistant isolates (MDRs) obtained in hospitals in Recife-PE, determining the prevalence of resistance and virulence genes and the *in vitro* influence of different antibiotics used in clinical practice, alone and in combination, on bacterial growth and expression of these genes. To perform the first stage of this study 37 isolates of *A. baumannii* complex, most of them MDR. Analysis of virulence gene expression was performed using three MDR isolates beyond ATCC 19606 from *A. baumannii* submitted *in vitro* to colistin, meropenem and association of these antimicrobials. The isolates were evaluated for confirmation of the species through detection of the gene for intrinsic β -lactamase, *bla*_{OXA-51-like}, and the Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI-TOF) technique. The clonal profile of these isolates was determined by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) using *Apa*I enzyme. Detection and sequence of *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} genes the insertion element, IS*Aba*1, and the virulence genes, *basC*, *ompA*, *pilA* and *csuE* were performed using Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. All isolates belonged to the *A. baumannii* species, distributed in 07 PFGE patterns, three isolates showed 100% similarity, which were obtained in two different hospitals of the study, suggesting an interhospital spread. Most isolates had the *bla*_{OXA-51-like} and IS*Aba*1 resistance genes, and either *bla*_{OXA-143-like} or *bla*_{OXA-23-like} gene. These results demonstrated high level resistance to carbapenems and other classes of antimicrobials, corroborating the MDR profile. This data alert for the spread of these genes among isolates in this hospitals. All isolates showed *basC*, *ompA*, *pilA* and *csuE* virulence genes, except for one isolate that did not show the *csuE* gene. Expression of *csuE*, *bfmS* e *baeS* virulence genes increased after *in vitro* submission to meropenem, colistin and the associated use may be demonstrated, reinforcing the need for surveillance for treating infections caused by MDR *A. baumannii* infections, even in associated antimicrobial use.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Virulence. Genetic expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

- Figura 1 - Principais mecanismos de resistência a carbapenêmicos em bactérias gram-negativas. 32
- Figura 2 - Principais mecanismos de resistência a polimixinas em bactérias gram-negativas. 34

ARTIGO 1

- Figura 1 - Polimorfismo genético de isolados de *A. baumannii* de pacientes atendidos em 2 hospitais de Recife - PE, detectado através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição Apal. 63

ARTIGO 2

- Figura 1 - Expressão relativa do gene *bfmS* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina 83
- Figura 2 - Expressão relativa do gene *baeS* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina 84
- Figura 3 - Expressão relativa do gene *csuE* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina. 85

LISTA DE TABELAS

TESE

- Tabela 1 - Espécies com nomes válidos que pertencem ao gênero *Acinetobacter* spp. 24
- Tabela 2 - Origem e características fenotípicas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo. 43
- Tabela 3 - Descrição dos primers utilizados neste estudo para determinar por PCR a presença dos genes de resistência e virulência presentes em isolados de *A. baumannii*. 47
- Tabela 4 - CIM dos isolados de *Acinetobacter baumannii* frente ao meropenem e colistina, e suc-CIMs utilizados para análise de tempo de morte e RT-qPCR. 52
- Tabela 5 - Primers utilizados nas reações de RT-qPCR para análise de expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS*, *baeS*, e do gene normalizador *gyrB*. 53

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo 58
- Tabela 2 - Primers utilizados neste estudo para determinar por PCR presença dos genes de resistência e virulência presentes em isolados de *A. baumannii*. 60
- Tabela 3 - Perfil de resistência e virulência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* incluídos neste estudo. 65

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Perfil de resistência e virulência dos isolados de *A. baumannii* analisados deste estudo. 79
- Tabela 2 – CIM, Sub-CIM e expressão dos genes de virulência, *csuE*, *bfmS* 80

e *baeS* em isolados de *Acinetobacter baumannii*

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR para análise de expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS*, *baeS* e do gene normalizador *gyrB*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Medida da intensidade de corrente elétrica
ACD	<i>Acinetobacter Cephalosporinases Derivative</i>
AIM-1	<i>Australian Imipenemase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CHEF-TE	Solução tampão de EDTA/TRIS
CIM	Concentração inibitória mínima
Clin. Vasc.	Clínica Vascular
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTX-M	Cefotaximase, primeiramente isolada em Munich
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIM-1	<i>Dutch Imipenemase</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Trisma base/Cloreto de magnésio
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão

EC	EDTA/Tris base/NaCl/N-lauril sarcosil
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
Enf.	Enfermaria
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ES	EDTA/N-lauril sarcosil
ESBL	<i>Extended Spectrum β-Lactamase</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GIM	<i>German Imipenemase</i>
IMP	Imipenemase
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a saúde
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
kDa	Kilodalton
KHM	<i>Kyorin University Hospital</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight
MBLs	Metalo- β -lactamases
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro

mM	MilliMolar
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não Determinado
NDM-1	<i>New Delhi MBL</i>
NE	Não Especificado
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OXA	Oxacilinase
pb	Pares de base
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel eletrophoresis</i>
R	Resistente
rDNA	<i>Ácido desoxirribonucleico ribossomal</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription qPCR</i>
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
S	Sensível
SDC	Sistema de Dois Componentes
Sec	Secreção
SIM-1	<i>Seul Imipenemase</i>
SPM-1	São Paulo MBL

STB	Secreção Traqueobrônquica
Sub- CIMS	Concentrações Sub- inibitórias Mínimas
TBE	Solução tampão de Tris/Borato/EDTA
TEN	Solução tampão de Tris/ EDTA/NaCL
TFP	Type IV pili/ <i>pili</i> tipo IV
TMB	Tripoli MBL
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages</i>
USAN	Unidade de Suporte Avançado em Neurocirurgia
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTQ	Unidade de Terapia de Queimados
UV	Ultra Violeta
V	Unidade de tensão elétrica
VIM	Verona Imipenemase
W	Unidade de potência
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	O Gênero <i>Acinetobacter</i> spp.	23
2.1.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	26
2.2	Estrutura e ação dos antibióticos β-lactâmicos	29
2.2.1	Carbapenêmicos	31
2.2.2	Polimixinas	32
2.3	Mecanismos de Resistência aos antibióticos β-lactâmicos	34
2.3.1	β -lactamases	35
2.4	Mecanismos de Virulência	38
2.4.1	Fatores de virulência	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	METODOLOGIA	43
4.1	Isolados bacterianos	43
4.2	MALDI-TOF MS	45
4.3	Extração do DNA total	45
4.4	Determinação da presença dos genes de virulência	46
4.5	Determinação da presença e sequência dos genes de resistência	47
4.6	Eletroforese em gel de agarose	48
4.7	Sequenciamento de DNA	48

4.8	Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE)	49
4.9	Critérios para seleção dos isolados para etapa de análise de expressão	50
4.10	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.11	Extração de RNA e síntese de cDNA	51
4.12	Determinação da expressão dos genes de virulência pela técnica de RT-qPCR	52
5	ASPECTOS ÉTICOS	53
6	RESULTADOS	54
	ARTIGO 1 - Disseminação clonal e de genes resistência e virulência em isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> obtidos em hospitais de Recife – PE, Brasil	54
	ARTIGO 2 – Expressão de genes de virulência em isolados multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> submetidos à colistina e meropenem	77
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A – Artigo 1 submetido a Microbial Drug Resistance	103
	APÊNDICE B – Artigo 2 submetido a Journal of Medical Microbiology article	105
	ANEXO A – Comprovante de submissão à revista Microbial Drug Resistance	107
	ANEXO B – Comprovante de submissão à revista Journal of Medical Microbiology article	108

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo gram-negativo pertencente ao gênero *Acinetobacter* spp. e surgiu como um dos mais importantes patógenos para as instituições de saúde mundiais (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; KROGER et al., 2017). Considerado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas como um dos seis patógenos mais graves, relacionado à preocupação com a ausência de progresso no desenvolvimento de novas linhas terapêuticas para o tratamento de infecções por isolados Multidroga Resistente (MDR). Isso ocorre devido à redução drástica no número de antimicrobianos efetivos que podem ser usados no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* em consequência a ampla resistência encontrada em isolados desta espécie bacteriana (BOUCHER et al., 2013; HENRY et al., 2015; QI et al., 2016).

Os genes de resistência intrínsecos para produção de β -lactamases são encontrados na maioria dos isolados de *A. baumannii*, como as cefalosporinases tipo AmpC, expressadas em nível basal (POIREL; NORDMAN, 2006). As cefalosporinases tipo AmpC quando superexpressas devido ao elemento de inserção *ISAbal* são a principal razão dos elevados níveis de resistência em *A. baumannii* às penicilinas e cefalosporinas (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). As carbapenemases do tipo OXA são as mais prevalentes em *A. baumannii* e as principais responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em todo o mundo (OPAZO et al., 2012; KOBBS et al., 2016).

A produção de β -lactamases em isolados de *A. baumannii* inclui também as metallo- β -lactamases (MBLs) (VIM, IMP e SIM), as quais conferem ampla resistência aos carbapenêmicos e a outros antibióticos β -lactâmicos, excluindo-se o aztreonam (POIREL; NORDMAN, 2006; ZARRILLI et al., 2009; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Vários outros genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos são amplamente disseminados entre outras espécies bacterianas, como os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}* os quais são amplamente encontrados em isolados MDR de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LIVERMORE et al., 2007), podendo ser facilmente transferidos a outras espécies bacterianas naturalmente competentes para a aquisição, como *A. baumannii* (EIJKELKAMP et al., 2011a). No Brasil, altas taxas de resistência à carbapenêmicos tem sido relatadas em isolados de *A.*

baumannii, mas pouco é conhecido sobre os seus mecanismos de resistência (TAKAGI et al., 2009).

Os carbapenêmicos eram os mais eficientes agentes antimicrobianos utilizados em infecções causadas por *A. baumannii*. No entanto, o uso excessivo dessa fármaco desencadeou a seleção de isolados resistentes a carbapenêmicos durante a década passada. Neste contexto, a colistina tem reaparecido como o último recurso terapêutico para o tratamento de infecções causadas por isolados de *A. baumannii* MDR, em razão das altas taxas de resistência à carbapenêmicos (CHEAH et al., 2016; MONTERO et al., 2016). Atualmente, menos de 2% dos isolados apresentam resistência à colistina, no entanto, novos relatos demonstram o aumento desse índice de resistência e consequente insucesso no tratamento clínico (HENRY et al., 2015). Alguns trabalhos têm sugerido, portanto, a associação de antimicrobianos para potencializar seu efeito bactericida (MENDES; BURDMANN, 2009).

Terapias de combinações com as polimixinas e carbapenêmicos foram propostas como boas opções para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR para otimizar e aumentar o poder bactericida da colistina e assim o sucesso do tratamento clínico, restringindo o aparecimento de resistência (NI et al., 2015). No entanto, pouco é conhecido sobre o impacto do uso da colistina na virulência bacteriana, associada ou não a antimicrobianos como os carbapenêmicos.

Apesar de ser considerado um patógeno com virulência limitada, infecções invasivas causadas por isolados de *A. baumannii* MDR estão associadas com o aumento da morbi-mortalidade em pacientes predispostos (MONTERO et al., 2016). Alguns destes fatores de virulência potencializam ainda mais a ação patogênica desta bactéria, tais como: sideróforos, sistemas de captação de ferro no qual o gene *basC* codifica uma proteína envolvida na primeira etapa da biossíntese do sideróforo acinetobactina; presença de fimbrias tipo 4, as quais são relacionadas com a motilidade bacteriana; e a capacidade de formação de biofilme, envolvida com a presença de vários genes, entre eles os genes *ompA*, *csuE* e *pilA* que contribuem para a adesão celular a superfícies bióticas e abióticas (EIJELKAMP et al., 2011b; HASAN, CHOI, OH, 2015; SELASI et al., 2016). Estudos recentes demonstram a contribuição desses fatores de virulência na patogênese de *A. baumannii*, sugerindo que esses mecanismos poderiam ser possíveis alvos de novos agentes

antimicrobianos, bloqueadores de fatores de virulência (LÓPEZ-ROJAS; SMANI; PACHÓN; 2013).

Apesar do grande envolvimento de isolados de *A. baumannii* em infecções hospitalares e do seu alto índice MDR, levando a poucas opções terapêuticas em casos de infecções causadas por esta espécie bacteriana, pouco é conhecido sobre a virulência e os mecanismos de resistência desta espécie (FOURNIER; RICHET, 2006). Atualmente, novos esforços para desenvolvimento de antimicrobianos se concentram na caracterização de fatores de virulência, como pili e biofilme, baseado na observação de uma correlação entre virulência e resistência aos medicamentos (DHABAAN et al., 2016). Um importante passo neste cenário envolve determinar qual o impacto do uso de antimicrobianos de última linha e combinações, utilizados na prática clínica, e a repercussão na expressão de genes de virulência encontrados em *A. baumannii* (KROGER et al., 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a relação clonal e os genes de resistência e virulência em isolados MDR de *A. baumannii* obtidos em dois hospitais públicos de Recife-PE, e a capacidade de expressão dos fatores de virulência após submissão dos isolados aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, meropenem, colistina e associação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Acinetobacter* spp.

No início do século 20, em 1911, o microbiologista holandês Beijerinck isolou e descreveu pela primeira vez um microrganismo que na ocasião o denominou de *Micrococcus calcoaceticus*, atualmente conhecido como *Acinetobacter* spp. No entanto, membros deste gênero foram classificados anteriormente sobre uma variedade de nomes, incluindo *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, o que resultou no retardo no estabelecimento da epidemiologia e da importância clínica do gênero *Acinetobacter* spp. (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; TOWNER, 2009). A denominação atual do gênero *Acinetobacter* vem da palavra grega “akineto” que significa não móvel, tendo sido proposta por Brisou e Prévot em 1954 para diferenciar dos microrganismos móveis que pertencem ao gênero *Achromobacter* (BRISOU; PRÉVOT, 1954; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Apenas em 1968 essa denominação tornou-se amplamente aceita, levando ao reconhecimento do gênero *Acinetobacter* pelo Subcomitê de Taxonomia de Moraxella e Bactérias Relacionadas, em 1971 (BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968).

O gênero *Acinetobacter* spp. é formado por cocobacilos gram-negativos, com DNA contendo de 39 a 47 mol% de G + C, sendo aeróbios, não fermentadores de carboidratos, sem capacidade de locomoção, catalase positiva, oxidase negativa e com bom crescimento em meio complexo entre 20 e 30°C sem requerer fatores de crescimento. Usualmente arranjam-se em diplobacilos ou em cadeias de comprimentos variados (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996).

As espécies bacterianas classificadas como membros do gênero *Acinetobacter* tem um longo histórico de variação taxonômica, desde a família Neisseriaceae à família Moraxellaceae (FOURNIER; RICHET, 2006). Em 1986 uma nova taxonomia foi estabelecida para o gênero *Acinetobacter*, sendo a espécie *A. baumannii* a mais encontrada em amostras clínicas obtidas de infecções clínicas e surtos hospitalares (CISNEROS; RODRÍGUES-BAÑO, 2002; GUNDI et al., 2009). O Gênero *Acinetobacter* apresenta 33 genoespécies diferentes, das quais as espécies genômicas 1 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 2 (*Acinetobacter baumannii*), 3 e 13TU são muitas vezes tão semelhantes que não podem ser diferenciadas por testes

fenotípicos e são referidas como o complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996). Essas quatro espécies genômicas são fenotipicamente semelhantes e intimamente relacionados em comparação a outras espécies do gênero baseada no processo de hibridização DNA-DNA (MACCONNELL; ACTIS; PACHÒN, 2013).

Devido a disponibilidade de vários métodos genotípicos para identificação do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, as genoespécies 3 e 13TU, passaram a se chamar *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente (MACCONNELL; ACTIS; PACHÒN, 2013). *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* apresentaram maior importância clínica no cenário nosocomial na última década, no entanto, as infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* ainda têm a maior relevância clínica, devido sua capacidade de persistir no ambiente hospitalar e pelo alto índice de isolamento de isolados multidroga-resistentes (MDR), extensamente resistente a drogas (XDR) ou pandroga resistente (PDR). Atualmente o gênero compreende 49 espécies com nomes válidos (www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html), conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies com nomes válidos que pertencem ao gênero *Acinetobacter* spp.

	Espécie de <i>Acinetobacter</i>	Referência
1	<i>Acinetobacter albensis</i>	Krisova et al. 2015
2	<i>Acinetobacter apis</i>	Kim et al. 2014
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bouvet and Grimont 1986
4	<i>Acinetobacter baylyi</i>	Carr et al. 2003
5	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Nemec et al. 2009
6	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	Nemec et al. 2010
7	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	Krizova et al. 2015
8	<i>Acinetobacter boissieri</i>	Álvarez-Pérez et al. 2013
9	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Carr et al. 2003
10	<i>Acinetobacter brisouii</i>	Anandham et al. 2011
11	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Beijerinck 1911) Baumann et al. 1968
12	<i>Acinetobacter courvalinii</i>	Nemec et al. 2016
13	<i>Acinetobacter dispersus</i>	Nemec et al. 2016
14	<i>Acinetobacter equi</i>	Poppel et al. 2016
15	<i>Acinetobacter gandensis</i>	Smet et al. 2014
16	<i>Acinetobacter gernerii</i>	Carr et al. 2003
17	<i>Acinetobacter grimontii</i>	Carr et al. 2003
18	<i>Acinetobacter guangdongensis</i>	Feng et al. 2014

19	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Nemec et al. 2010
20	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	Nemec et al. 2009
21	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	(ex Stenzel and Mannheim 1963) Bouvet and Grimont 1986
22	<i>Acinetobacter harbinensis</i>	Li et al. 2014
23	<i>Acinetobacter indicus</i>	Malhotra et al. 2012
24	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bouvet and Grimont 1986
25	<i>Acinetobacter junii</i>	Bouvet and Grimont 1986
26	<i>Acinetobacter kookii</i>	Choi et al. 2013
27	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	(Audureau 1940) Brisou and Prévot 1954
28	<i>Acinetobacter modestus</i>	Nemec et al. 2016
29	<i>Acinetobacter nectaris</i>	Álvarez-Pérez et al. 2013
30	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Nemec et al. 2011
31	<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	Abbas et al. 2015
32	<i>Acinetobacter parvus</i>	Nemec et al. 2003
33	<i>Acinetobacter pittii</i>	Nemec et al. 2011
34	<i>Acinetobacter Populi</i>	Li et al. 2015
35	<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	Nemec et al. 2016
36	<i>Acinetobacter puyangensis</i>	Li et al. 2013
37	<i>Acinetobacter qingfengensis</i>	Li et al. 2014
38	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Nishimura et al. 1988
39	<i>Acinetobacter rudis</i>	Vaz-Moreira et al. 2011
40	<i>Acinetobacter schindleri</i>	Nemec et al. 2001
41	<i>Acinetobacter seifertii</i>	Nemec et al. 2015
42	<i>Acinetobacter soli</i>	Kim et al. 2009
43	<i>Acinetobacter tandoii</i>	Carr et al. 2003
44	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	Carr et al. 2003
45	<i>Acinetobacter townneri</i>	Carr et al. 2003
46	<i>Acinetobacter ursingii</i>	Nemec et al. 2001
47	<i>Acinetobacter variabilis</i>	Krizova et al. 2015
48	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Vaneechoutte et al. 2009 ex Di Cello et al. 1997
49	<i>Acinetobacter vivianii</i>	Nemec et al. 2016

Fonte: www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html

Comparado a outros bacilos gram-negativos, espécies do gênero *Acinetobacter* tem maior capacidade de sobrevivência na região das pontas dos dedos e em superfícies secas quando testadas em condições ambientais similares ao ambiente hospitalar. Adicionalmente, a contaminação da pele de pacientes e profissionais de saúde pode estar relacionada a transmissão dos isolados e surtos (JAWAD et al., 1998; HARDING et al., 2013). Outra rota de transmissão para os pacientes inclui os equipamentos reutilizáveis, tais como: tubo de ventilação, respirômetro e dispositivo para monitoramento da pressão arterial utilizados em pacientes graves, além de objetos como colchões, travesseiros, TV e ventiladores,

os quais podem servir de reservatório durante surtos de IRAS, em razão da capacidade desses patógenos de resistir à dessecação (JAWAD et al., 1998; HARDING et al., 2013).

De um modo geral, os membros do gênero *Acinetobacter spp.* são considerados ubíquos, no entanto, as espécies de importância clínica, incluindo *A. baumannii* não são microrganismos ubíquos, nem possuem habitat natural conhecido fora do hospital, sendo isolados em pacientes e em ambientes hospitalares durante surtos (JOLY-GUILLOU, 2005; TOWNER, 2009; HARDING et al., 2013).

2.1.1 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii desempenha papel importante na colonização e infecção de pacientes hospitalizados com altas taxas de morbi-mortalidade, sendo um importante patógeno oportunista envolvido numa variedade de IRAS, incluindo bacteremias, infecções do trato urinário, meningites secundárias e infecções de feridas cirúrgicas. No entanto, seu papel predominante é como agente causador de pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes internados em UTI (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; MA et al., 2015; SAFARI et al., 2015).

A espécie *A. baumannii* é responsável por 2 – 10% das IRAS causadas por bactérias gram-negativas (JOLY-GUILLOU, 2005; ANTUNES, VISCA, TOWNER, 2014). Está entre os quatro patógenos que mais causam infecções da corrente sanguínea relacionadas a catéter em pacientes adultos em UTIs brasileiras (GIRARDELLO et al., 2016). Além das infecções causadas por *A. baumannii* em ambiente hospitalar, esse patógeno também pode causar infecções na comunidade, incluindo pneumonia, bacteremia, infecções de pele, tecidos moles, meningite secundária e endocardites (CHANG, et al., 2000; FALAGAS et al., 2007). Acomete mais o sexo masculino e está relacionado geralmente a idosos, pacientes etilistas, fumantes e portadores de comorbidades como diabetes mellitus, doença obstrutiva pulmonar crônica e doenças renais (FALAGAS, RAFAILIDIS, 2007; ANTUNES, VISCA, TOWNER, 2014). A pneumonia desenvolvida na comunidade por esse patógeno pode ser mais severa em relação à desenvolvida em ambiente hospitalar (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014).

Desde a identificação de *A. baumannii* como um patógeno emergente existe um grande interesse no rápido desenvolvimento de resistência antimicrobiana e na

disseminação em ambiente hospitalar de isolados desta espécie bacteriana (SAHL et al., 2011).

O controle e o tratamento de infecções causadas por isolados MDR de *A. baumannii* está entre os mais difíceis comparado às infecções causadas por outros bacilos gram-negativos resistentes a antimicrobianos (MARAGAKIS, PERL, 2008). *A. baumannii* ganhou notoriedade e integra o grupo de bactérias patogênicas responsáveis por causar a maior proporção de infecções por isolados multidroga-resistentes (MDR) adquiridas nos hospitais, são os patógenos “ESKAPE”, representados por *Enterococcus faecium* (E), *Staphylococcus aureus* (S), *Klebsiella pneumoniae* (K), *Acinetobacter baumannii* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (P) e *Enterobacter* (E) (LANNAN et al., 2016).

Os antimicrobianos potencialmente efetivos contra infecções causadas por esta espécie bacteriana incluem os carbapenêmicos, aminoglicosídeos (amicacina ou gentamicina), tetraciclina (minociclina ou doxiciclina) e sulbactâmicos (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008). A resistência a esses agentes antimicrobianos tem aumentado, resultando na utilização de agentes potencialmente mais tóxicos como as polimixinas (TAKAGI et al., 2009).

A extensa resistência de isolados de *A. baumannii* a diferentes classes de antimicrobianos pode comprometer o tratamento de infecções causadas por este microrganismo (VILA; PACHÓN, 2012). Trabalhos recentes revelaram que isolados de *Acinetobacter* spp. resistente a carbapenêmicos são mais predominantes na América Latina, Oriente Médio e Ásia-Pacífico do que na América do Norte e Europa (ADIBHESAMI et al., 2016).

A espécie *A. baumannii* pode apresentar uma ampla variedade de β -lactamases que hidrolisam e conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, além de resistência intrínseca e baixa permeabilidade da membrana externa a certos antimicrobianos, bem como a expressão constitutiva de diferentes bombas de efluxo (MARAGAKIS; PERL, 2008; ZHAO et al., 2015).

A ampla resistência desta espécie bacteriana a múltiplos antimicrobianos está relacionada ainda à capacidade de adquirir e incorporar facilmente elementos genéticos móveis tais como plasmídeos, transposons e integrons (NEONAKIS; SPANDIDOS; PETINAKI, 2011; ATROUNI et al., 2016) ou até por mutações que levam a modificação do alvo do antibiótico, da expressão de bombas de efluxo ou da permeabilidade de membrana, o que favorece a prevalência de isolados MDR. Nas

últimas décadas a disseminação de resistência entre isolados de *A. baumannii* vem aumentando no mundo inteiro dificultando o tratamento de infecções até mesmo com medicamentos clinicamente disponíveis como tigeciclina, colistina e carbapenêmicos (ATROUNI et al., 2016). A identificação dos mecanismos de resistência em isolados de *A. baumannii* trará melhoras no resultado de infecções causadas por esse patógeno.

Surtos causados por *A. baumannii* MDR tem sido relatados em vários países, com sucesso terapêutico usando aminoglicosídeos, carbapenêmicos, inibidores de β -lactamases, tigeciclina, rifampicina e colistina. Embora carbapenêmicos intravenosos e inibidores de β -lactamases atinjam níveis aceitáveis no sistema nervoso central (SNC), doses mais altas do que a regular de carbapenêmicos em combinação com inibidores de β -lactamases, aminoglicosídeos ou rifampicinas podem não ser eficazes para infecção no SNC por *A. baumannii* pandroga-resistente (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2010).

Quando o tratamento com carbapenêmicos e aminoglicosídeos não são eficazes, as polimixinas são a opção terapêutica indicada, incluindo a polimixina B e a colistina, apesar do aparecimento de relatos de isolados clínicos de *A. baumannii* apresentando resistência à polimixinas (NATION, VELKOV, LI, 2014; CHEAH et al., 2016). A modificação do lipídio A com fosfoetanolamina e/ou galactosamina, e a perda completa de lipopolissacarídeo da membrana externa são dois mecanismos de resistência às polimixinas conhecidos em isolados de *A. baumannii* até o momento (MOFFATTI et al., 2010; CHEAH et al., 2016).

2.2 Estrutura e ação dos antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são os antibióticos mais prescritos mundialmente, devido a sua boa atividade e baixa toxicidade (HAEGGMAN et al., 2004; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Neste grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos, sendo todos portadores de um anel β -lactâmico, formado de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TRABULSI et al., 2002). A entrada do antimicrobiano nas células bacterianas se dá por proteínas denominadas “porinas” as quais se comportam como canais iônicos e que se localizam na membrana externa de bactérias gram-negativas, possuindo afinidade específica pelos diferentes antimicrobianos (KONEMAN et al., 2012; TRIPATHI., 2006).

Esta classe de drogas interfere na síntese da parede celular bacteriana, afetando o crescimento e desenvolvimento normal das células bacterianas. Nos microrganismos gram-positivos a parede celular tem uma espessura constituída por 50 a 100 moléculas, enquanto nos gram-negativos tem uma espessura constituída por apenas 1 a 2 moléculas (GOODMAN; GILMAN, 2006). A biossíntese do peptideoglicano envolve cerca de trinta enzimas bacterianas, incluindo as transpeptidases e as glicosiltransferases, podendo ser dividida em três estágios. No primeiro estágio as bactérias sintetizam um pentapeptídeo do UDP-ácido-N-acetilmurâmico e UDP-N-acetilglicosamina. No segundo ocorre a ligação dos dois aminoaçúcares, onde os radicais de peptideoglicano são unidos entre si formando longos filamentos e o UDP é clivado. Na terceira e última etapa ocorre o término da formação de ligação cruzada que consiste na clivagem da D-alanina terminal das cadeias peptídicas por transpeptidases com liberação da energia liberada e subsequente utilização no estabelecimento de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas dos filamentos vizinhos, fornecendo estabilidade e rigidez à parede celular (TRIPATHI, 2006; GOODMAN; GILMAN, 2006). Os antibióticos β -lactâmicos inibem as transpeptidases, não ocorrendo a ligação cruzada, diminuindo a estrutura entrelaçada e rígida da parede celular. Estas proteínas relacionadas à síntese final do peptideoglicano constituem as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs - protein binding penicilin) que se localizam na parte externa da membrana celular das bactérias e que podem ser classificadas em três classes baseado na presença do domínio funcional conservado (TRABULSI et al., 2002; McPHERSON; POPHAM,

2002; TRIPATHI, 2006; CAIÔ et al., 2011). Apenas a classe A de PBPs tem um domínio N-terminal que contém seqüências de aminoácidos conservados, encontrados em todas as glicosiltransferases responsáveis pela polimerização do peptidoglicano (McPHERSON; POPHAM, 2002).

As PBPs variam em suas afinidades pelos diferentes antibióticos β -lactâmicos, embora as ligações se tornem covalentes. Algumas PBPs de bactérias gram-negativas são responsáveis pela síntese do peptidoglicano, outras são necessárias para a manutenção da forma de bastonetes da bactéria e na formação de septos durante a divisão bacteriana. A inibição de algumas transpeptidases leva a formação de esferoblastos e a uma rápida lise. Entretanto, a inibição das atividades de outras PBPs pode causar lise tardia (PBP2) ou a produção de longas formas filamentosas da bactéria (PBP3) (GOODMAN; GILMAN, 2006; KONEMAN et al., 2012).

Quando as bactérias se dividem na presença de um antibiótico β -lactâmico são produzidas formas deficientes de parede celular e como o meio interno da bactéria é mais hiper osmótico, as células intumescem e sofrem ruptura. Em certas condições e no caso de alguns microrganismos são produzidas formas filamentosas ou de morfologia indefinida, incapazes de se multiplicar. O efeito lítico destas substâncias também pode se dever a não repressão de algumas autolisinas bacterianas que normalmente funcionam na divisão celular (TRABULSI et al., 2002; TRIPATHI, 2006).

A grande utilização dos β -lactâmicos possibilitou a seleção de isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos, levando a elaborações mais recentes de antibióticos, visando a maior eficiência frente a estes isolados bacterianos portadores de resistência. Na maioria dos casos a resistência a este grupo de antimicrobianos é conferida pela produção de enzimas chamadas de β -lactamases, capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos, transformando-os em produtos inativos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; TRABULSI et al., 2002; HAEGGMAN et al., 2004; OPAZO et al., 2012). Estas enzimas tem sido grandes alvos de estudos microbiológicos, bioquímicos e genéticos no mundo inteiro. Diversas investigações têm descrito mais de 190 proteínas bacterianas com a habilidade de interagir com uma variedade de moléculas descritas como substratos ou inibidores. Devido a esta diversidade de características enzimáticas das β -

lactamases, muitas tentativas foram realizadas para categorizar estas enzimas pelo uso de seus atributos bioquímicos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

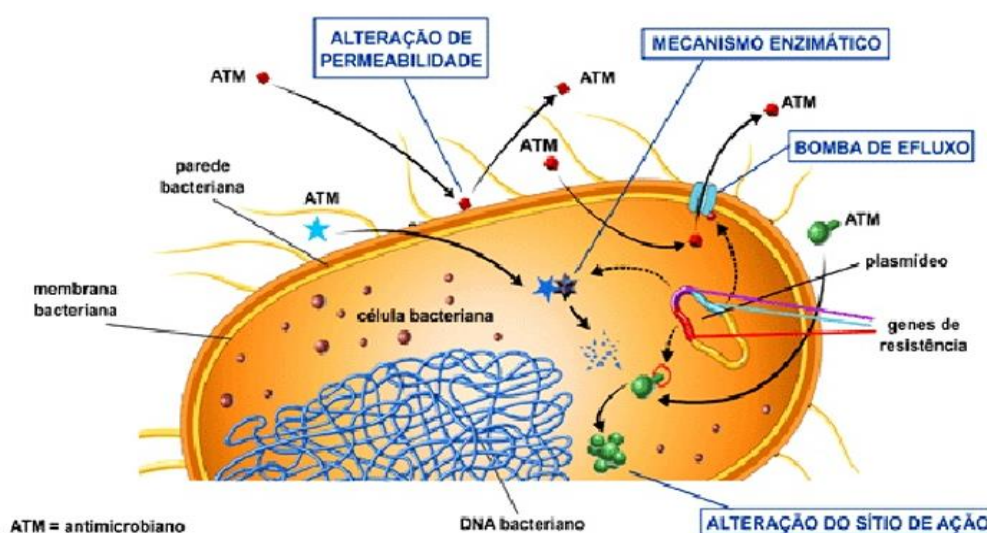
2.2.1 Carbapenêmicos

Nas últimas décadas, o rápido acúmulo de mecanismos de resistência a muitas classes de antimicrobianos resultou na eliminação de penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclinas como opção de tratamento para casos de infecções por isolados de *A. baumannii*, resultando na indicação dos carbapenêmicos para terapia de infecções causadas por *A. baumannii*, devido sua boa atividade e baixa toxicidade (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Os carbapenêmicos imipenem, meropenem, doripenem, com exceção do ertapenem, são os escolhidos para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, quando outros antimicrobianos não são eficazes (VILA; PACHÓN, 2012). Essa classe de antimicrobianos foi utilizada como último recurso no tratamento de infecções por *A. baumannii* até 1991, quando surgiram os primeiros relatos de isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (ADIBDESAMI et al., 2016). A tendência de aumento de resistência ao meropenem foi observada em isolados de *A. baumannii* em várias regiões geográficas (EVANS et al. 2013).

A maioria dos isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos não são resistentes apenas a esta classe de antimicrobianos mas também a quase todas as classes comumente utilizadas clinicamente, levando a denominação destes isolados a *A. baumannii* extensivamente resistente a drogas (XDR-AB) (MAGIORAKOS et al., 2012; FAN et al., 2016). Os mecanismos de resistência a carbapenêmicos presentes em *Acinetobacter* spp. incluem alterações de permeabilidade em proteínas de membrana externa e em proteínas de ligação a penicilina, ativação de bombas de efluxo e hidrólise por β -lactamases (PELEG et al., 2008). Na maioria dos isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, a produção de carbapenemases está relacionada a presença de β -lactamases de classe D que hidrolisam carbapenêmicos, as carbapenemases do tipo OXA, classificadas em cinco subgrupos. Quatro dos subgrupos são carbapenemases adquiridas, que incluem OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-143. O subgrupo OXA-51 é intrínseco a espécie *A. baumannii* (OPAZO et al., 2012; BIGLARI et al., 2015).

Quando o tratamento com carbapenêmicos e aminoglicosídeos não são eficazes, as polimixinas são a opção terapêutica indicada, a polimixina B e a colistina, apesar do aparecimento de relatos de isolados clínicos de *A. baumannii* apresentando resistência à polimixinas (NATION, VELKOV, LI, 2014; CHEAH et al., 2016).

Figura 1: Principais mecanismos de resistência a carbapenêmicos em bactérias gram-negativas.



Fonte: MARTINEZ-MARTINEZ, L et al., 1999.

2.2.2 Polimixinas

As polimixinas compõem um grupo de antimicrobianos ativos contra várias bactérias gram-negativas. São compostos anfipáticos catiônicos, constituídos de decapeptídeos policatiônicos cíclicos caracterizados por um anel heptapeptídeo entre o grupo amino da cadeia lateral de ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) na posição 4 e o grupo carboxila do resíduo de treonina C-terminal na posição 10 e um ácido graxo ligado ao peptídeo através de uma ligação amida (MENDES; BURDMANN, 2009; VELKOV et al., 2013). Essa classe de antimicrobianos possui um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas, as polimixinas A, B, C, D e E, sendo esta última chamada de colistina, isolada pela primeira vez no Japão em 1949 do *Bacillus polymyxa* var. Colistinus, tornando-se disponível para o uso clínico em 1959 (KARAIKOS et al., 2015). Somente as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente, em virtude da grande toxicidade das demais (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; MENDES; BURDMANN, 2009). A colistina possui ação bactericida contra

bactérias gram-negativas, interagindo com a porção lipídica A do lipopolissacárido (LPS) causando assim a desorganização da membrana externa. No entanto, em razão de relatos de nefro e neurotoxicidade e do surgimento de antibióticos menos tóxicos como os aminoglicosídeos, a colistina foi quase abandonada para o uso clínico no ano de 1970 (CAI et al., 2012; HENRY et al., 2015). A polimixina B e a colistina clinicamente utilizadas apresentam uma farmacocinética clínica marcadamente diferente e são administradas de formas distintas, sendo a polimixina B como sal de sulfato e a colistina como um sal de sódio (NATION; VELKOV; LI, 2014).

A polimixina E é constituída por dois componentes principais, colistina A (polimixina E1) e colistina B (polimixina E2). É administrado na forma de um pró-fármaco, metanossulfonato de colistina (CMS), que é menos tóxico e que é hidrolisado a várias espécies intermediárias tanto *in vitro* como *in vivo* antes de formar a colistina (KARAIKOS et al., 2015).

A colistina tem reaparecido como o último recurso terapêutico para o tratamento de infecções causadas por isolados de *A. baumannii* MDR, em razão das altas taxas de resistência à carbapenêmicos e a outras alternativas terapêuticas anteriores (CHEAH et al., 2016; MONTERO et al., 2016). Atualmente, menos de 2% dos isolados apresentam resistência à colistina, no entanto, novos relatos demonstram o aumento desse índice de resistência e consequente insucesso no tratamento clínico (HENRY et al., 2015), apesar do aparecimento de trabalhos sugerindo a associação de antibióticos para potencializar seu efeito bactericida (MENDES; BURDMANN, 2009).

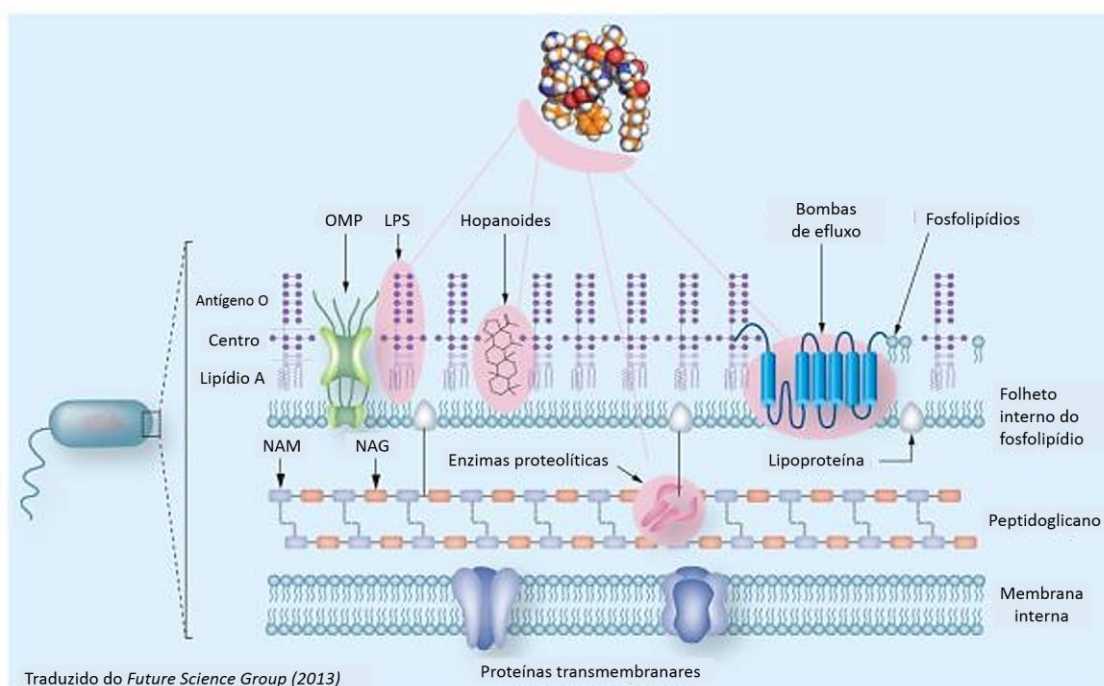
Internacionalmente, a colistina parenteral é muito mais utilizada, embora a polimixina B injetável esteja disponível em vários países, como Brasil, Singapura e Estados Unidos; ambos antimicrobianos estão disponíveis nestes três países (VELKOV et al., 2013).

A modificação do lipídio A com fosfoetanolamina e/ou galactosamina, e a perda completa de lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa são dois mecanismos de resistência às polimixinas conhecidos em isolados de *A. baumannii* até o momento (MOFFATT et al., 2010; CHEAH et al., 2016).

Na espera de novos antibióticos, temos que otimizar o uso clínico de polimixinas através da aplicação de princípios farmacocinéticos/farmacodinâmicos, minimizando assim o desenvolvimento de resistência (VELKOV et al., 2013).

Contudo, observações de crescimento rápido após o tratamento com colistina *in vitro*, heteroresistência e baixas concentrações plasmáticas colocaram em dúvida a eficácia da colistina em monoterapia (FAN et al., 2016). Por essa razão, muitos profissionais médicos preferem prescrever terapêutica de associação de fármacos para tratar infecções por *A. baumannii* XDR, especialmente considerando os efeitos sinérgicos observados entre a colistina e outros antimicrobianos, comprovados em vários estudos *in vitro* (NI et al., 2015; FAN et al., 2016).

Figura 2: Principais mecanismos de resistência a polimixinas em bactérias gram-negativas.



Fonte: VELKOV et al., 2013. O sombreado rosa indica determinantes moleculares de resistência à polimixinas. LPS: Lipopolissacarídeo; NAG: N-acetilglucosamina; NAM: ácido N-acetilmurâmico; OMP: Proteína da membrana externa.

2.3 Mecanismos de Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A resistência adquirida aos β -lactâmicos pode ocorrer basicamente por três mecanismos: alteração de proteínas alvo (PBPs), reduzindo assim a atividade do antibiótico; impermeabilidade da célula bacteriana ao antibiótico, impedindo a chegada do mesmo ao local de ação; e produção de β -lactamases que inativam o antibiótico utilizado. O mecanismo mais comum de resistência das enterobactérias aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases (BUSH, 2001).

Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* incluem a produção de β -lactamases como as β -lactamases de classe D, metalo- β -lactamases e mais raramente às carbapenemases de classe A. Além da produção de β -lactamases outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência de isolados de *A. baumannii*, incluindo a diminuição da permeabilidade da membrana externa, associada à perda ou diminuição da expressão de proteínas porinas e provavelmente a superexpressão de bombas de efluxo (CAIÔ et al., 2011).

Existe grande interesse na identificação dos mecanismos de resistência encontrados em isolados de *A. baumannii*, necessários para otimizar o resultado dos tratamentos de infecções causadas por esse patógeno. *A. baumannii* apresenta mecanismos de resistência complexos, incluindo ativação ou produção de enzimas, captação de integrons, permeabilidade de membrana externa, mecanismos de expulsão de drogas, entre outros (ZHAO et al., 2015).

2.3.1 β -lactamases

A produção de β -lactamases é um dos mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos. São enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo a síntese da parede celular bacteriana (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). Isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos presentes em unidades de saúde estão frequentemente associados, na maioria das vezes, à aquisição de carbapenemases do tipo OXA, incluindo os genes *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-23-like}. A disseminação inter e intra hospitalar de isolados abrigando esses genes de resistência tem aparecido em relatos no mundo todo (ALIRAMEZANI et al., 2016).

As β -lactamases de classe A de Ambler, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas e são, geralmente, susceptíveis a inibidores de β -lactamases. A maioria das β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) pertencem a esse grupo de enzimas, onde encontramos as famílias de enzimas TEM, SHV e CTX-M, já relatadas em isolados de *A. baumannii* (BUSH, JACOBY, 2010; EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; <http://www.lahey.org/studies/>). A presença de mutações nos genes que codificam as enzimas TEM e SHV propiciam o desenvolvimento de

ESBLs com perfil de substrato expandido, o que permite a hidrólise de todas as cefalosporinas, penicilinas e aztreonam. A detecção fenotípica e molecular de genes ESBL, como SHV e TEM, pode fornecer dados adequados sobre a epidemiologia e os fatores de risco gerados por bactérias que produzem ESBL (LATIFPOUR; GHOLIPOUR; DAMAVANDI, 2016).

A primeira confirmação de ESBLs no Brasil foi realizada em 1997, quando pesquisadores documentaram a presença dessas enzimas em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitais privados e públicos do Rio de Janeiro e São Paulo (SAMPAIO; GALES, 2016). As ESBLs mais prevalentes estão incluídas nos grupos TEM, SHV e CTX-M sendo principalmente encontradas em isolados de *Klebsiella* spp. *Escherichia coli* e em outras espécies de *Enterobacteriaceae*. As ESBLs do tipo CTX-M vem se tornando as ESBLs mais predominantes nos últimos anos em relação as convencionais do tipo TEM e SHV, no mundo (KHOSRAVI; HOVEIZAVI; MEHDINEJAD, 2013), e são mais predominantes na Europa e América do Sul, incluindo o Brasil (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Recentemente, mais de 170 variantes de CTX-M têm sido identificadas no mundo todo, e são divididas em 5 grupos de acordo com suas similaridades de sequência de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. No Brasil, as CTX-M são as ESBLs mais prevalentes, particularmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

Dentre as carbapenemases serina-dependentes da classe molecular A incluem-se as enzimas SME, IMI, GES, NMC e KPC (BUSH; JACOB, 2010). A primeira publicação de KPC no Brasil foi em 2009, através do relato da detecção de KPC-2 em isolados obtidos de quatro pacientes da cidade de Recife - PE, nordeste do Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016). Até o momento, 22 variantes de β -lactamase KPC foram identificadas. As β -lactamases KPC podem hidrolisar todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e ácido clavulânico. São encontradas em muitas espécies gram-negativas, incluindo *Enterobacteriaceae* e espécies não fermentadoras (incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*), no entanto, são mais predominantes em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (CHEN et al., 2015).

As β -lactamases de classe B de Ambler, as metallo- β -lactamases, são capazes de hidrolisar uma variedade de antibióticos β -lactâmicos, exceto aztreonam, não sofrendo ação de inibidores de β -lactamases. As enzimas da família IMP e VIM

são mais frequentemente encontradas em *A. baumannii*, comumente carregadas por integrons, o que causa grande preocupação devido a habilidade de hidrolisar carbapenêmicos colocar em risco o êxito do tratamento de infecções (EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013). Dentre as metalo- β -lactamases (MBL), atualmente dez subclasses são conhecidas, incluindo: IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (São Paulo MBL), GIM (German Imipenemase), SIM-1 (Seul Imipenemase), AIM-1 (Australian Imipenemase), KHM (Kyorin University Hospital), NDM-1 (New Delhi MBL), DIM-1 (Dutch Imipenemase), and TMB (Tripoli MBL). No Brasil, as mais prevalentes são as subclasses IMP-1 e SPM-1 (GONÇALVES et al., 2016).

As β -lactamases de classe C de Ambler (conhecidas como enzimas AmpC) são frequentemente encontradas nos cromossomos ou também plasmídeos de microrganismos gram-negativos. Em *Acinetobacter* spp. são referidas como enzimas ADC (*Acinetobacter Cephalosporinases Derivative* -Cefalosporinases Derivadas de *Acinetobacter*), que podem hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro restrito, no entanto, quando são super expressas podem conferir resistência a cefalosporinas de amplo espectro, exceto as de quarta geração. Em *A. baumannii*, a super expressão e a resistência a cefalosporinas de amplo espectro está diretamente relacionada à presença do elemento de inserção *ISAbal*, que atua como promotor e favorece a expressão dos genes *bla_{ADC}* (HOWARD et AL., 2012; EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; WRIGHT et al., 2014).

As carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA) da classe D de Ambler são as principais responsáveis pela resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos no mundo em isolados de *A. baumannii*. Existem 150 variantes descritas até o momento, onde 45 mostram atividade para hidrolisar carbapenêmicos. As enzimas OXAs são geneticamente divididas em 6 subgrupos, amplamente encontradas em *A. baumannii* adquiridos por elementos genéticos móveis, os exemplos mais mencionados são *bla_{OXA-23-like}* (OXA-23, OXA-27, and OXA-49), *bla_{OXA-24-like}* (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, and OXA-72), *bla_{OXA-58-like}*, *bla_{OXA-143-like}* (OXA-143, OXA-231, and OXA-253), *bla_{OXA-235}*, and *bla_{OXA-51-like}*, este último subgrupo presente a nível cromossomal na espécie *A. baumannii*, mas que não proporciona um nível de resistência clinicamente efetiva a carbapenêmicos, a não ser com a presença do elemento de inserção *ISAbal*. (EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; NIGRO, HALL, 2016; KOBBS et al., 2016). LEE et al. em 2012, encontraram plasmídeos carregando a

estrutura genética IS*Aba1-bla*_{OXA-51-like}, certamente via transposição e também em isolados de *Acinetobacter nosocomialis*, elevando o nível de resistência a carbapenêmicos e colocando em dúvida a utilização da detecção desse gene para diferenciar *A. baumannii* de outras espécies de *Acinetobacter spp.*

Isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos são uma ameaça a saúde e estão frequentemente associados a aquisição de carbapenemases do tipo OXA, carreando, na maioria das vezes, os genes *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-23} (ALIRAMEZANI et al., 2016).

Bactérias gram-negativas e gram-positivas são afetadas pelo aparecimento e aumento de resistência antimicrobiana, um problema que continua a crescer, fazendo-se necessário à descrição e classificação das bactérias que são resistentes a múltiplos antimicrobianos, sendo importante a coleta e compartilhamento de dados de vigilância e epidemiologia entre unidades de saúde da região e do mundo inteiro (MAGIORAKOS et al., 2011).

2.4 Mecanismos de Virulência

2.4.1 Fatores de virulência

A virulência é o grau de patogenicidade dentro de um grupo ou espécies de organismos, não sendo atribuída a um só fator, mas a vários parâmetros relacionados ao microrganismo, ao hospedeiro e à interação entre ambos (KONEMAN, 2012).

Usualmente, um dos fatores relacionado à virulência bacteriana é formado por uma estrutura de superfície da célula bacteriana, conhecida como adesina e receptores complementares na superfície das células suscetíveis. As adesinas bacterianas incluem fímbrias, componentes da cápsula e ácidos lipoteicóicos que se projetam para o exterior do glicopeptídeo da parede celular das bactérias gram-positivas ou outros antígenos de superfície celular. Adicionalmente, as estruturas capsulares de algumas bactérias possibilitam aos microrganismos escaparem da fagocitose, impedindo a interação entre a superfície da célula bacteriana e a célula fagocitária ou ocultando componentes da superfície celular bacteriana que de outro modo poderiam interagir com as células fagocitárias e levar à ingestão do microrganismo (KONEMAN, 2012).

Pouco se conhece sobre os genes e fatores envolvidos em propriedades de virulência, além disso, as atividades de sideróforos e propriedades de aderência desempenham um papel na fase inicial da colonização e na manutenção da infecção (FOURNIER; RICHET, 2006).

Embora *A. baumannii* seja considerado um patógeno relativamente pouco invasivo, algumas características desta espécie bacteriana podem aumentar a virulência dos isolados envolvidos em IRAS. Entre os fatores de virulência relatados nesta espécie bacteriana, estão inclusos: adesão a células epiteliais humanas e superfícies abióticas pela produção de fimbrias e/ou cápsula polissacarídica, formação de biofilme, produção de cápsula polissacarídica e sistemas de aquisição de ferro (BRAUN; VIDOTTO, 2004; ZIMBLER et al., 2009).

A patogênese de *A. baumannii* depende inicialmente da captação e utilização de ferro, elemento essencial envolvido nas funções celulares básicas. As bactérias patogênicas respondem a limitação de ferro através da expressão de diferentes sistemas de captação de ferro dependentes ou não de sideróforos (PENWELL et al., 2012). O sistema de aquisição de ferro mais bem caracterizado em *A. baumannii* é o sideróforo acinetobactina, um mecanismo de alta afinidade, sofisticado e desenvolvido para a obtenção de ferro, suprindo a pouca disponibilidade de ferro e a disputa com as células do hospedeiro. São necessários três sistemas para compor o sideróforo acinetobactina; o primeiro, onde a biossíntese da acinetobactina é realizada por proteínas codificadas pelos genes *basA*, *basB*, *basC*, *basD*, *basF*, *basG*, *basH*, *basI*, and *basJ*. No segundo sistema a acinetobactina é secretada através de um sistema de efluxo da superfamília ABC, consistindo nas proteínas codificadas por *barA* e *barB*. Por último a terceira etapa, na qual os complexos de acinetobactina-ferro movem-se para células bacterianas através de um receptor para complexos de ferro-acinetobactina, formados pelas proteínas codificadas por *bauA*, *bauB*, *bauC*, *bauD*, *bauE* e *bauF* (HASAN, CHOI, OH, 2015). A acinetobactina é um sideróforo catecol-hidroxamato não cíclico derivado do ácido 2,3-dihidroxibenzóico ligado a treonina e N-hidroxihistamina (PENWELL et al., 2012).

Entre os determinantes de virulência presentes em isolados de *A. baumannii* que conferem maior patogenicidade a esses patógenos estão a membrana externa, vesículas de membrana externa, fosfolipases D e biofilme (NOWAK, PALUCHOWSKA, 2016). A proteína A de membrana externa de *A. baumannii* é uma porina trimérica e está comprometida com o transporte do soluto e virulência da

bactéria, além de participar da patogenicidade induzindo a apoptose, imunomodulação, aderência e invasão celular às células do hospedeiro e a formação de biofilme (LIN, 2015).

Um dos fatores de virulência diretamente relacionados com a permanência do paciente hospitalizado é a formação de biofilme. A habilidade dos isolados de *A. baumannii* em permanecer na ponta dos dedos, plásticos, vidros, utensílios médicos, no ambiente e em superfícies secas, até mesmo sob condições adversas como dessecação e desinfecção, facilitam a preservação da bactéria no ambiente hospitalar facilitando o desenvolvimento de IRAS e, conseqüentemente, o aparecimento de surtos (ESPINAL, MARTI, VILA, 2012; RYU, BAEK, KIM, 2016; SELASI et al., 2016). Nas etapas de formação de biofilme participam diversos genes, entre eles o *ompA*, principal proteína de membrana externa, e o *csuE*, envolvido na formação do sistema pili, de forma que a inativação desse gene elimina a produção de pili e a formação de biofilme (SELASI et al., 2016). O biofilme formado por isolados de *A. baumannii* possibilita a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antimicrobianas (CHEN, 2015), considerado um dos mais importantes e frequentes fatores de virulência em isolados clínicos de *A. baumannii* (LONGO, VUOTTO, DONELLI, 2014). A resistência a antibióticos das células de biofilme pode ser atribuída a alterações fisiológicas na permeabilidade da membrana e atividade metabólica (HE et al., 2015).

Embora descrito como um patógeno sem mobilidade, por não possuir flagelo, isolados clínicos de *A. baumannii* tem apresentado capacidade de motilidade envolvida com a capacidade de espalhamento (*swarming*) e contração (*twitching*) (EIJKELKAMP et al., 2011, VIJAYKUMAR, BALAJI, BISWAS, 2015). O sistema de pili tipo IV (TFP), no qual o gene *pilA* codifica a subunidade principal pilina A, intercede na mobilidade espasmo (*twitching*), iniciando com a montagem do TFP e a ligação e retração do pilus, facilitando assim a translocação da célula na direção do ponto de ligação (EIJKELKAMP et al., 2011b, HARDING et al., 2013). O TFP participa de outros processos como: transferência horizontal, adesão à célula do hospedeiro e formação de biofilme (PIEPENBRINK et al., 2016).

O envelope bacteriano é exposto a mudanças e estresses ambientais, como variação de temperatura, pH, exposição a compostos tóxicos e estresse oxidativo. Como resposta a tais variações, as bactérias desenvolveram um sistema de resposta, geralmente regulando a expressão gênica (LEBLANC et al., 2011).

Normalmente, um sistema de dois componentes (SDC) é composto de um sensor proteína quinase associado à membrana plasmática que responde a estímulos extracelulares e / ou intracelulares, transmitindo um sinal através da fosforilação de um regulador de resposta (KROGER et al., 2017). O SDC bacteriano é um sistema que facilita a modificação de expressão de genes em resposta à estímulos ambientais.

O SDC BaeSR regula positivamente genes de bombas de efluxo em isolados de *A. baumannii*, incluindo a expressão das bombas AdelJK e MacAB-TolC, resultando num aumento de susceptibilidade à tigeciclina (LIN; LIN; LAN; 2015; KROGER et al., 2017). Outro SDC, o BfmSR participa da formação de biofilme em isolados de *A. baumannii* quando regula a expressão das chaperonas csuA/BABCDE, estabilizando a expressão do operon csu e a expressão dos genes *csuC* e *csuE*, responsáveis pela formação de pili necessários para a aderência e formação de biofilme bacteriano (LUO et al., 2015; KROGER et al, 2017).

É de grande relevância o entendimento das estruturas presentes na superfície celular e as que se estendem além da superfície, para a compreensão da patogênese de um microrganismo visto que determinantes de virulência bacteriana, poderiam ser alvos futuros de novos antibióticos e vacinas (WEBER; HARDING; FELDMANB, 2016).

O aumento e a importância crescente de surtos causados por isolados patogênicos de *A. baumannii*, tem levado a comunidade científica e médica a tentar compreender os mecanismos causadores de doenças desses microrganismos, com grande interesse em novas estratégias de tratamento visto a escassez de novos recursos para o combate desse patógeno que vem se tornando intratável (WEBER; HARDING; FELDMANB, 2016; KROGER et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a relação clonal, a ocorrência e sequência de genes de resistência, do elemento de inserção *ISAbal* e de genes de virulência em isolados MDR de *A. baumannii* obtidos em dois hospitais públicos do Recife-PE, além de determinar a expressão de genes de virulência em isolados submetidos aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a relação clonal de isolados MDR de *A. baumannii*;
- b) Verificar a ocorrência e a sequência dos genes de resistência aos β -lactâmicos *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-51-like}*, *bla_{OXA-23-like}*, *bla_{OXA-58-like}* e *bla_{OXA-143-like}* e do elemento de inserção *ISAbal* em isolados MDR de *A. baumannii*;
- c) Verificar a ocorrência dos genes de virulência *basC*, *csuE*, *ompA*, *pilA*, *bfmS* e *baeS* em isolados MDR de *A. baumannii*;
- d) Verificar a expressão dos genes de virulência *bfmS*, *baeS* e *csuE* em isolados MDR de *A. baumannii* com ou sem meropenem, colistina e a associação destes antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizado o desenho experimental. Este tipo de estudo foi o que se adequou ao objetivo do corrente trabalho, que se destina a analisar os efeitos causados por antibióticos β -lactâmicos, colistina e meropenem na expressão de diferentes fatores de virulência, assim como determinar a relação clonal e quais genes estão envolvidos na resistência e virulência de isolados de *A. baumannii* obtido em dois hospitais públicos de Recife-PE.

4.1 Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram utilizados 37 isolados MDR de *A. baumannii*, obtidos de IRAS e por pesquisa de vigilância a partir de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade do Recife-PE. Foram utilizados 27 isolados obtidos do Hospital A nos anos de 2013 e 2014 e 10 a partir do Hospital B no ano de 2014 (tabela 2). A determinação da espécie e o perfil de susceptibilidade destes isolados a diferentes antimicrobianos foi determinado no hospital de origem utilizando o sistema automatizado VITEK 2 (Biomérieux). As colônias foram transferidas para caldo BHI acrescidos de 20% de glicerol e estocados a -80°C . Para realização das análises foram cultivados em caldo BHI por 18 horas a 37°C .

Tabela 2. Origem e características fenotípicas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo.

Isolado	Hosp.	Isolamento	Setor do hospital	Perfil de Resistência
45	A	Ponta de cateter	UTI	CTX, CPM, CAZ, CIP, GM, IMI, MEM, PRL
113	A	Ponta de cateter	UTI	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
119	A	Sec. Traqueal	UTI	CFX, CFX/AX, MEM
123	A	Ponta de cateter	Enf. 7° andar	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM
136	A	Sec. Traqueal	UTI	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM, PRL
165	A	Escara	UTI	AMO/AC, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
248	A	Sec. Traqueal	UTI	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, MEM, PRL

253	A	Swab nasal	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM,
281	A	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
322	A	LCR	USAN	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
325	A	Sec. Traqueal	USAN	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
349	A	Sec. Traqueal	UTI	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, GM, IMI, MEM, PRL
390	A	Líquor	USAN	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
468	A	Swab retal/pesq. vig.	UTI	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
486	A	Ferida operatória	Enf. 5° andar	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
513	A	Hemocultura	UTI	CTX, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
516	A	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	AK, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
563	A	Sec. Traqueal	UTI	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT
578	A	Hemocultura	UTI pediátrica	CTX
781	A	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
799	A	Sec. Traqueal	UTI	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
808	A	LCR	UTI pediátrica	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, XFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
829	A	Sec. Região tórax	UTQ Adulto	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT
931	A	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	AK, SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, MEM, PRL
1000	A	Líquor	Enf. 5° andar	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
1188	A	Ponta de cateter	UTI	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
4076	A	NE	NE	AK, CTX, CPM, CRO, CIP, GM, IMI, LEV, MEM, PRL, TN, TS
24	B	Partes moles	Ambulatório	CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM
54	B	Catéter	UTI	AK, SAM, CPM, CAZ, CRO, CIP, COL, GM, IMI, MEM
55	B	Catéter	UTI	CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM
60	B	STB	UTI	CPM, CAZ, CRO, CIP, IMI, MEM
298	B	Sangue	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
307	B	Urina	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM
338	B	Sec. Traqueobrônquica	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM
379	B	Líq. cav.abdominal	UTI	AK, CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM
412	B	STB	UTI	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM
570	B	Sangue	UTI	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM

Sec: secreção; LCR: Líquido Cefalorraquidiano; USAN: Unidade de Suporte Avançado em Neurocirurgia; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; UTQ: Unidade de Terapia de Queimados; Enf: enfermagem; Clín Vasc: clínica vascular; STB: Secreção traqueobrônquica; R: Resistente; S: Sensível; ND: não determinado; NE: não especificado; CTX: Cefotaxima; CPM: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; PRL: Piperacilina; CFX/AX: Cefuroxima Axetil; SAM: Ampicilina; CRO: Ceftriaxona; AMO/AC: Amoxicilina/Ácido Clavulânico; COL: Colistina; LEV: Levofloxacina; NFT: Nitrofurantoína; AK: Amicacina; TN: Tobramicina; TS: Trimetoprim-Sulfametoxazol; CFX: Cefuroxima.

4.2 MALDI-TOF MS

A confirmação da identificação bacteriana dos isolados de *A. baumannii* foi realizada através da técnica de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de Vôo/Espectômetro de Massa (MALDI-TOF MS). A extração das proteínas ribossomais foi realizada após cultivo bacteriano em ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), segundo as recomendações do fabricante (MALDI Biotyper® Protocol Guide, BRUKER). As colônias bacterianas foram inoculadas com alça bacteriológica de 1 µL, ressuspensas em 300 µL de água destilada estéril em microtubos de 1,5 mL e misturadas vigorosamente. Foram adicionados 900 µL de etanol absoluto (Carlo Erba, Rodano, Milao, Italia) e centrifugados por 2 minutos a 13.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 50 µL de ácido fórmico 70 % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A este sedimento foi adicionado ainda 50 µL de acetonitrila 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), misturado vigorosamente em vortex e então centrifugados novamente por 2 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente, 1 µL do sobrenadante de cada amostra extraída foi pipetado em triplicata em uma placa de aço inox com 96 *spots*, assim como 1 µL do calibrante para peptídeos de baixo peso molecular (Bruker Daltonics, Alemanha). Após completa secagem do extrato das proteínas ribossomais, 1 µL da matriz CHCA foi dispensado sobre as amostras (10 mg/mL - *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Logo após a secagem, a placa de aço foi introduzida no espectrômetro de massas Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha) para identificação das amostras pelo MALDI Biotyper RTC3. 3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As análises foram realizadas no laboratório ALERTA da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob a colaboração da Profa. Dra. Ana Cristina Gales.

4.3 Extração do DNA total

Todos os 37 isolados de *A. baumannii* foram plaqueados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Infusão de Cérebro e Coração) e Ágar Bacteriológico a 1,5% para crescimento a 37°C por 18 horas. As colônias isoladas foram repicadas e crescidas em BHI por 18 horas a 37°C para a extração do DNA total, utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. Um ml da

cultura foi utilizado para realização da extração após centrifugação a 14000 rpm por 4 minutos. Após retirada do sobrenadante e adição de 600 µL de solução de lise nuclear a amostra foi ressuspensa e incubada a 80°C por 5 minutos para posterior resfriamento a temperatura ambiente. Posteriormente, 3 µL de solução de RNase foi adicionada à amostra, para incubação a 37°C por 60 minutos e resfriamento a temperatura ambiente. Após adição de 200 µL de solução precipitadora de proteína a amostra foi homogeneizada em vórtex por 20 segundos, resfriada em gelo por 5 minutos para posterior centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro recipiente contendo 600 µL de isopropanol para centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado cuidadosamente com posterior adição de 600µL de etanol a 70% para lavagem do DNA. Após a lavagem, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos para retirada do etanol. Todo o resíduo de etanol foi retirado em centrifuga de secagem por 5 minutos para posterior adição de 50 µL da solução reidratante de DNA e armazenamento a - 20°C. O DNA obtido foi quantificado e analisado quanto ao grau de pureza utilizando NanoDrop 2000 (NPT 3 – Núcleo de Plataforma Tecnológicas/CPqAM).

4.4 Determinação da presença dos genes de virulência

A presença dos genes de virulência *pilA*, *csuE*, *ompA* e *basC* foi determinada em todos os isolados de *A. baumannii* através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando os primers descritos na tabela 3.

As reações de PCR foram realizadas individualmente para cada gene utilizando um volume total de 25µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,5µl de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato a 200 µM (GeHealthcare), 0,75 µl de MgCl₂ a 1,5 mM, 1µl de cada primer a 15 pmol/µl, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia (CPqAM/FIOCRUZ), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 59°C (gene *pilA*), 57°C (gene *csuE* e *ompA*) e 58°C (gene *basC*) para anelamento dos primers, acrescido de um minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos foi

realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C.

4.5 Determinação da presença e sequência dos genes de resistência

A determinação dos genes de resistência foi realizada através de PCR utilizando os primers descritos na tabela 2. A reação de PCR e ciclagem foi a mesma utilizada nas amplificações dos genes de virulência, alterando apenas a temperatura de anelamento referente a cada gene analisado, incluindo 59°C para o gene *bla*_{OXA-51 like}, 56°C para o *bla*_{OXA-23 like}, 58 °C para *bla*_{OXA-143 like}, 54 °C para *bla*_{IMP}, 63°C para o *bla*_{VIM}, 66°C para o *bla*_{KPC}, 63°C para *bla*_{CTX-M} e 62°C para o *ISAbal*.

Tabela 3. Descrição dos primers utilizados neste estudo para determinar por PCR a presença dos genes de resistência e virulência presentes em isolados de *A. baumannii*.

Gene	Primer	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>basC</i>	basC F	CATTCAGCGGAGTTTGCA	405	DORSEY et al., (2004)
	basC R	CGATTCAACTTCGCAGCT		
	OmpAF	CAATTGTTATCTCTGGAG		
<i>ompA</i>	OmpAR	ACCTTGAGTAGACAAACGA	952	TURTON et al. (2007)
<i>pilA</i>	pilAF	GGCAATTGCGATTCTGCTT	138	Proposto neste estudo
	pilAR	TGCAGCTGAACCATTAGCGA		
<i>csuE</i>	CsuEF	ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC	580	TURTON et al. (2007)
	CsuER	CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATA AG		
<i>bla</i> _{OXA-51 like}	OXA-51-like F OXA-51-like R	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	WOODFORD et al.(2006)
<i>bla</i> _{OXA-23 like}	OXA-23-like F OXA-23-like R	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	WOODFORD et al.(2006)
<i>bla</i> _{OXA-143 like}	OXA-143-like F OXA-143-like R	TGGCACTTTTCAGCAGTTTCTT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149	HIGGINS, LEHMANN, SEIFERT, (2010)
<i>ISAbal</i>	ISAbal1a ISAbal1b	ATGCAGCGCTTCTTTGCAGG ATGATTGGTGACAATGAAG	389	MUGNIER et al., 2009
<i>bla</i> _{KPC}	KPC 1F KPC R	GCTACACCTAGCTCCACCTTC TATTTTCCGAGATGGGTGAC	371	MOLAND (2003); YIGIT et al. (2001)
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-DIA-F IMP-DIA-R	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCAT	364	DONG et al. (2008)
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-DIA-F VIM-DIA-R	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG AGGTGGGCCATTAGCCAGA	523	DONG et al. (2008)
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX - MA1 CTX – MA2	SCSATGTGCAGYACCAAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	543	SALADIN et al., 2002

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização dos resultados 6 µl dos amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com 2µl de Blue green (LGC Biotechnology) utilizando tampão TBE 0,5x em cuba de eletroforese horizontal por 45 minutos, sob as seguintes condições: 100V, 190mA, 150W. Os produtos da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (Transiluminator LOCCUS biotecnologia – L. PIX) e fotodocumentados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas – NPT3 do CPqAM/FIOCRUZ.

4.7 Sequenciamento de DNA

Os genes de resistência e virulência dos isolados 119, 113, 338, 570 e 808 foram sequenciados, utilizando os iniciadores descritos na tabela 3.

Para seqüenciamento os amplicons foram purificados utilizando o PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, 200 µl de tampão de ligação foi adicionado a 50 µl do amplicon para homogeneização, transferido para a coluna fornecida pelo fabricante e centrifugado a 10.000xg por 1 min. Em seguida, foi adicionado 650 µl de tampão de lavagem. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a coluna foi re-inserida dentro do tubo de coleta. Após a secagem do material por centrifugação o sobrenadante foi descartado e o DNA foi recuperado pela adição de 10 µl tampão de eluição.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1992), na subunidade do Núcleo de Plataformas Tecnológicas I do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ. A análise das sequências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando os programas DNASTAR e BLAST no National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As sequências dos genes *bla*_{OXA-51 like}, *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-143 like}, *ISAbal*, *csuE*, *ompA* e *BasC* foram depositadas no Genbank database.

4.8 Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE)

A avaliação da similaridade genética de todos os isolados de *A. baumannii* deste estudo foi realizada pela técnica de PFGE, objetivando analisar e comparar o perfil genético de cada isolado. As amostras selecionadas foram cultivadas em Ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), das quais, 3 colônias foram incubadas em 3 mL de caldo BHI (infusão de cérebro e coração) (biomérieux, França). Após 18 horas de incubação em agitação a 37°C, as culturas líquidas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm, e os sobrenadantes foram descartados. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de solução salina, transferidos para tubos de microcentrífuga previamente pesados e centrifugados por 1 minuto a 12.000 rpm. O sobrenadante de cada microtubo foi desprezado, o sedimento pesado com a finalidade de subtrair o peso do microtubo, e então ressuspensos em solução salina na proporção 1:1 entre o volume do diluente e o sedimento pesado. Após a homogeneização dessa suspensão de células em vórtex, 7 µL da suspensão bacteriana foi transferida para tubos de microcentrífuga contendo 300 µL de tampão TEN (EDTA 0,5 M, pH 7,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; Tris base 1 M, pH 7,0; Tris base 1 M, pH 7,0; NaCl 4,0 M; e água destilada), e homogeneizadas rapidamente com 340 µL de agarose ultrapura com baixo ponto de fusão a 2% (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Essa mistura foi transferida cuidadosamente para moldes de plugs (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA) impedindo a formação de bolhas.

Os blocos de géis permaneceram por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente até completa solidificação. Depois de solidificados os plugs foram transferidos para uma placa de microdiluição de 12 poços contendo 2 mL de tampão EC (EDTA 0,5 M, pH 7,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; Tris base 1 M, pH 7,0; Tris base 1 M, pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); Brij 58 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); deoxicolato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); e água destilada). Após a incubação dos plugs por aproximadamente 12 horas a 37°C, o tampão EC foi removido, e os blocos de gel lavados com 2 mL de tampão CHEF-TE (EDTA 0,5 M, pH 7,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; Tris base 1 M, pH 7,0; Tris base 1 M, pH 8,0; e água destilada) por 2 vezes com intervalos de 30 minutos entre as lavagens. Em seguida, incubados a 50°C por aproximadamente 12 horas com 2 mL de tampão ES (EDTA 625 mM, pH 9,3; N-lauril sarcosil 5% (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) contendo 100 µL de

proteínase K (20 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, EUA). Após essa etapa de lise da parede celular, os blocos de géis foram lavados 4 vezes com intervalo de 1 hora entre as lavagens com o tampão CHEF-TE, até completa remoção dos reagentes anteriores. Os plugs foram mantidos a 5°C até a etapa de digestão do DNA. A digestão do DNA bacteriano foi realizada em placa de microdiluição de 96 poços, onde somente 1/3 do bloco de gel foi utilizado para essa etapa. Os plugs cortados foram lavados 4 vezes com intervalos de 1 hora entre as lavagens com 200 µL de DNS (Trisma base 1 M, pH 8,0; cloreto de magnésio 1 M (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e água destilada) em temperatura ambiente. Após a última lavagem e remoção do DNS, os blocos de géis foram incubados por 1 hora a 4°C com o tampão de enzima de restrição sem a enzima (5 µL do tampão “NEBuffer” (New England Biolabs, Ipswich, EUA), 0,5 µL de BSA (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e 44,5 µL de água destilada). Após esse período, a placa com os blocos de géis foram incubados novamente a 5°C com o tampão de enzima de restrição contendo 10 unidades da enzima de restrição ApaI (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Essa etapa de clivagem do DNA bacteriano ocorreu a 37°C entre 12 a 20 horas. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em TBE 0,5 X (Tris base 0,089 M, Ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M) no sistema CHEF-DR II (BioRad Laboratories Inc., Hercules, EUA) à temperatura de 14°C e uma corrente elétrica de 6.0 Volts/cm com um “Switch” Time Inicial - Final 5,0 - 60 durante 19 horas. O gel foi corado com brometo de etídio 10 mg/mL e fotografado sob luz ultravioleta. A comparação foi realizada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice e o dendrograma formado pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) com tolerância de 1,0% no programa Bio Numerics (versão 6.6, Applied Maths).

4.9 Critérios para seleção dos isolados para etapa de análise de expressão de virulência

Foram selecionados três isolados de *A. baumannii*. para a análise de expressão dos genes *csuE*, *bfmS* e *baeS*. Os critérios dessa seleção foram:

- a) Isolados pertencentes a grupos filogenéticos diferentes;
- b) Isolados apresentando resistência fenotípica ao meropenem, detectada pelo aparelho automatizado VITEK® 2;

- c) Todos os isolados selecionados serem portadores dos genes de virulência pesquisados no estudo;
- d) Todos os isolados selecionados portadores do gene *bla*_{OXA-51-like} e *ISAba1*.

4.10 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As CIM dos agentes antimicrobianos meropenem e colistina foram determinadas pelo teste de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton (KASVI), utilizando a cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* como controle, segundo recomendações do CLSI, 2013. Os três isolados bacterianos selecionados e a ATCC 19606 foram incubados por 18 horas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C. O inóculo foi comparado e ajustado à escala 0,5 de MacFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Posteriormente os isolados foram inoculados em caldo Mueller-Hinton contendo as concentrações de 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µg/ml de cada antimicrobiano. Os isolados foram então incubados para crescimento por 18 horas em estufa a 37 °C. Os resultados para meropenem e colistina foram interpretados segundo o CLSI 2013.

4.11 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os três isolados e a ATCC 19606 de *A. baumannii* selecionados (54, 113, 808 e ATCC 19606) foram submetidos por 6 horas a concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) dos antibióticos isoladamente e em associação (Tabela 4). Foi incluído um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antimicrobiano. A extração do RNA total foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (2001), modificado. Brevemente, 2 mL da cultura crescida a 37°C por 6 horas em caldo Mueller Hinton cátion ajustado (Sigma Aldrich), foi centrifugado e o sedimento ressuspenso em Tiocianato de Guanidina. O RNA foi precipitado com isopropanol e ressuspenso em H₂O ultra pura livre de RNases. Posteriormente foi realizada a purificação com DNase (DNase I – Sigma Aldrich) segundo normas do fabricante. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop 2000 e a pureza e integridade conferida em gel de agarose 1% preparado em água DEPC (Água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato). A partir do RNA obtido foi realizada a síntese do cDNA para

utilização nos ensaios de RT-qPCR utilizando os primers descritos na tabela 5. A elaboração do cDNA foi realizada utilizando a Enzima Transcriptase Reversa M-MLVRT (200 U/uL) (Promega) e Randon Primer (0,5 ug/uL) (Promega), segundo recomendações do fabricante.

Tabela 4. CIM dos isolados de *Acinetobacter baumannii* frente ao meropenem e colistina, e suc-CIMs utilizados para análise de tempo de morte e RT-qPCR.

Isolado	MEROPENEM (µg/ml)		COLISTINA (µg/ml)	
	CIM	Sub-CIM	CIM	Sub-CIM
54	64	8	4	1
113	2	0,25	2	0,25
808	64	8	16	1
ATCC 19606	0,125	0,0625	2	0,5

Fonte: Autor, 2016; CIM: Concentração Inibitória Mínima; sub-CIM: Concentração Sub-inibitória mínima.

4.12 Determinação da expressão dos genes de virulência pela técnica de RT-qPCR

Para a realização da RT-qPCR *primers* específicos para cada gene analisado foram utilizados (tabela 5). Foram testados os genes *gyrB* e *rpoB* para ser utilizado como gene de referência, no entanto o gene *gyrB* foi escolhido como gene de referência para todas as reações de RT-qPCR uma vez que apresentou a menor variabilidade entre as condições testadas. Reações sem *Transcriptase Reversa* foram utilizadas como controles negativos, sendo consideradas negativas as reações com dez ciclos de diferença das reações contendo a transcriptase. Curvas de *melting* foram utilizadas para verificar a amplificação de um fragmento único. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. O método de expressão relativa foi utilizado para determinar os níveis de expressão do genes e a análise dos dados foi realizada a partir do programa Applied Biosystem e a análise estatística com o One Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett, $p < 0.05$. Os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Tabela 5. *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR para análise de expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS*, *baeS*, e do gene normalizador *gyrB*.

Gene	Primer	Sequência de primers (5'→ 3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>csuE</i>	<i>csuE_F</i>	GCTTGGCTTTAGCAAACATGACC	194	Luo et al., 2015
	<i>csuE_R</i>	ATTGCCATCAGGCCCCGCTA		
<i>bfmS</i>	<i>bfmS_F</i>	ACCGCCCGTAATCCGAAC	127	Luo et al., 2015
	<i>bfm_R</i>	TGAACTTATTCCACCGCCTTTA		
<i>baeS</i>	<i>baeS_F</i>	CATTCTTTTCGATGAACACACTCTCA	133	Henry et al., 2015
	<i>baeS_R</i>	CTTCAAATGGTTGATATTCCGAAGG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB_F</i>	CGAGGGTGACTCAGCGGGTG	101	Henry et al., 2015
	<i>gyrB_R</i>	GCGCACGCTCAACGTTTCAGG		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB_F</i>	AGTCACGCGAAGTTGAAGGT	188	Henry et al., 2015
	<i>rpoB_R</i>	AGCACGCTCAACACGAACTA		

5 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto não necessitou ser submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE, uma vez que os isolados utilizados neste estudo foram obtidos de ambiente hospitalar a partir demanda espontânea de IRAS diretamente do laboratório de microbiologia, dos hospitais fontes, sem nenhum contato com os pacientes ou prontuários médicos.

6 RESULTADOS

ARTIGO 1 –Submetido a Microbial Drug Resistance

Disseminação clonal e de genes de resistência e virulência em isolados de *Acinetobacter baumannii* obtidos em hospitais de Recife – PE, Brasil

Introdução

Acinetobacter baumannii é um dos mais importantes patógenos oportunistas, com uma alta incidência de infecções em pacientes imunocomprometidos e responsável por surtos hospitalares, principalmente em unidades de terapia intensivas (UTI) (HOWARD et al., 2012). *A. baumannii* é classificado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) como um dos seis mais importantes patógenos multidroga-resistentes (MDR) distribuídos em hospitais ao redor do mundo responsáveis por significativas taxas de mortalidade e morbidade (TALBOT et al, 2006; BOUCHER et al., 2013, ANTUNES, VISCA, TOWNER, 2014).

A capacidade em adquirir genes de resistência e permanecer em ambientes inanimados são as principais características desse patógeno nosocomial (VALI et al., 2015), colocando em risco procedimentos médicos como: cirurgias, transplantes, e o tratamento de pacientes imunocomprometidos e hematológicos (POTRON, POIREL, NORDMANN, 2015).

Isolados de *A. baumannii* com perfil MDR estão relacionados à grande variedade de infecções nosocomiais (Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS), incluindo bacteremias, infecção do trato urinário, meningite secundária, infecções em queimaduras e feridas, infecções na pele e tecidos moles, osteomielite, endocardite e pneumonia associada à ventilação mecânica. Estas infecções são frequentemente relacionadas à dificuldade de tratamento, devido a grande resistência dessa bactéria aos principais grupos de antimicrobianos, tornando-se um desafio aos tratamentos antibióticos atuais (BERGOGNE-BEREZIN, TOWNER, 1996; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008; ANTUNES, VISCA, TONER, 2014; BISWAS, 2015). A escassez de novas drogas para tratamento de infecções por bactérias gram-negativas é um desafio para a medicina moderna, onde *Acinetobacter* spp. apresenta-se como o microrganismo mais evidente no paradigma da pan-resistência, particularmente *A. baumannii* (EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013).

As terapias antimicrobianas indicadas para o tratamento de infecções por isolados MDR de *A. baumannii* compreendem cefalosporinas de amplo espectro, sulbactam inibidor de β -lactamase, quinolonas, carbapenêmicos, amicacina, doxiciclina e minociclina; tigeciclina e colistina de forma isolada ou associada, no entanto, existem relatos de resistência a todos os antimicrobianos disponíveis, inclusive à colistina (VALI et al., 2015; MA et al., 2015; GALES et al., 2001). O desafio no tratamento das infecções causadas por *Acinetobacter* spp. está amplamente relacionado à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ESBLs, carbapenemases, ou por mudanças nas proteínas de membrana externa e proteínas ligadoras de penicilina (GALES et al., 2001).

Dentre os mecanismos de resistência mais comuns está a produção de β -lactamases, principalmente as de classe D de Ambler (conhecidas como oxacillinases ou β -lactamases do tipo OXA) nas espécies de *Acinetobacter* spp, em particular em *A. baumannii*, causando resistência a carbapenêmicos que são a primeira opção de tratamento em infecções causadas por isolados MDR desta espécie bacteriana (LEE et al., 2012; NIGRO, HALL, 2016). A β -lactamase OXA-51-like é uma enzima codificada cromossomicamente e intrínseca à espécie, com mais 70 variantes já identificadas, mas que não proporciona um nível de resistência clinicamente efetiva a carbapenêmicos, a não ser com a presença do elemento de inserção *ISAbal*. (NIGRO, HALL, 2016).

Outras quatro famílias são amplamente encontradas em *A. baumannii*, incluindo a OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like adquiridos por elementos genéticos móveis (EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; NIGRO, HALL, 2016). A disseminação de resistência a antimicrobianos e sua capacidade de permanecer em ambientes bióticos e abióticos por longo períodos são problemas de grande importância em IRAS causadas por isolados de *A. baumannii* (EIJKELKAMP et al., 2011; LONGO, VUOTTO, DONELLI, 2014; VALI et al., 2015).

Além de diversos mecanismos de resistência encontrados em *A. baumannii* vários fatores de virulência podem contribuir para evolução de infecções por esta espécie bacteriana. A proteína A de membrana externa codificada pelo gene *ompA* é uma porina trimérica relacionada ao transporte do soluto e virulência bacteriana, além de participar da patogenicidade induzindo a apoptose,

imunomodulação, aderência e invasão celular das células do hospedeiro e formação de biofilme (LIN, 2015).

A patogênese de *A. baumannii* é relacionada também à utilização de ferro, um elemento essencial envolvido nas funções celulares básicas. A captação de ferro é facilitada pela produção de sideróforos, como a acinetobactina, suprindo a pouca disponibilidade de ferro e a disputa com as células do hospedeiro. O gene *basC* codifica uma proteína envolvida na primeira etapa na biossíntese de acinetobactina (HASAN, CHOI, OH, 2015).

Embora descrito como um patógeno sem mobilidade por não possuir flagelo, isolados clínicos de *A. baumannii* tem apresentado um sistema de pili tipo IV (TFP) o qual intercede na mobilidade espasmo (*twitching*), iniciando com a montagem do TFP, ligação do pilus e retração do pilus, facilitando assim a translocação da célula na direção do ponto de ligação (HARDING et al., 2013; EIJKELKAMP et al., 2011, VIJAYKUMAR, BALAJI, BISWAS, 2015). O TFP participa também de outros processos como: transferência horizontal, adesão à célula do hospedeiro e formação de biofilme (PIEPENBRINK et AL., 2016).

Um dos fatores de virulência diretamente relacionados com a habilidade de *A. baumannii* em permanecer em superfícies abióticas do ambiente hospitalar é a formação de biofilme, facilitando a preservação da bactéria neste ambiente, tornando-se assim uma ameaça para novos surtos por serem mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antimicrobianas (ESPINAL, MARTI, VILA, 2012; RYU, BAEK, KIM, 2016; CHEN, 2015). Nas etapas de formação de biofilme participam diversos genes, entre eles *ompA*, *csuE* e *pilA*, envolvidos na formação do sistema *pili* (SELASI et al., 2016).

Isolados MDR de *A. baumannii* envolvidos em IRAS, continuam a representar um grave problema de saúde pública, demandando pesquisas de vigilância para o controle de surtos (BLANCO-LOBO et al., 2016). O aumento de infecções nosocomiais causados por isolados MDR de *A. baumannii* e sua resistência aos principais antimicrobianos torna imprescindível a rápida identificação e controle de surtos. A técnica de PFGE é considerada “padrão ouro” na tipagem epidemiológica (SEIFERT et al., 2005), auxiliando os dados epidemiológicos (MAGALHÃES et al., 2005). Uma ferramenta poderosa para discriminar subtipos de isolados bacterianos e na investigação epidemiológica em infecções causadas por *A. baumannii* (CHANG et al., 2013).

O desafio encontrado no tratamento de infecções causadas por isolados MDR de *A. baumannii* e o grande envolvimento desta espécie em casos de IRAS em Recife-PE, Brasil, assim como em vários locais do mundo, demonstra a importância na determinação da presença dos principais genes de resistência e virulência encontrados em isolados de *A. baumannii* obtidos em hospitais públicos de Recife. Este estudo visa a compreensão dos fatores que estão associados à capacidade de *A. baumannii* em permanecer em ambiente hospitalar, favorecendo sua disseminação e a epidemia causada por esse patógeno oportunista, contribuindo para um melhor entendimento do controle de surtos hospitalares.

Metodologia

Isolados bacterianos.

Neste estudo foram utilizados 37 isolados de *A. baumannii* com perfil multidroga-resistente, obtidos de IRAS e por pesquisa de vigilância a partir de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade do Recife-PE. Foram utilizados 27 isolados obtidos do Hospital A nos anos de 2013 e 2014 e 10 a partir do Hospital B no ano de 2014 (tabela 1). A determinação da espécie e o perfil de susceptibilidade destes isolados a diferentes antimicrobianos foi determinado no hospital de origem utilizando o sistema automatizado VITEK 2 (Biomérieux).

Tabela 1. Isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo.

Isolado	Hosp.	Espécie (VITEK®)	Isolamento	Setor do hospital	CIM (µg/mL) – VITEK®	
					MERO	COL
45	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Ponta de cateter	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
113	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Ponta de cateter	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
119	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	<0,25 (S)	≤0,5 (S)
123	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Ponta de cateter	Enf. 7° andar	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
136	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
165	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Escala	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
248	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
253	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab nasal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
281	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
322	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	LCR	USAN	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
325	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	USAN	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
349	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
390	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Líquor	USAN	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
468	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab retal/pesq. vig.	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
486	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Ferida operatória	Enf. 5° andar	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
513	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Hemocultura	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
516	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
563	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
578	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Hemocultura	UTI pediátrica	0,5 (S)	≤0,5 (S)
781	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
799	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
808	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	LCR	UTI pediátrica	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
829	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Região tórax	UTQ Adulto	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
931	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Swab nasal/pesq. vig.	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
1000	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Líquor	Enf. 5° andar	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
1188	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	Ponta de cateter	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
4076	A	Comp. <i>A. baumannii</i>	NE	NE	>8	ND
24	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Partes moles	Ambulatório	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
54	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Catéter	UTI	≥ 16 (R)	≥ 16 (R)
55	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Catéter	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
60	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	STB	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
298	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sangue	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
307	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Urina	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
338	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sec. Traqueobrônquica	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
379	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Líq. cav.abdominal	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
412	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	STB	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)
570	B	Comp. <i>A. baumannii</i>	Sangue	UTI	≥ 16 (R)	≤0,5 (S)

Sec: secreção; LCR: Líquido Cefalorraquidiano; USAN: Unidade de Suporte Avançado em Neurocirurgia; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; UTQ: Unidade de Terapia de Queimados; Enf: enfermagem; Clín Vasc: clínica vascular; STB: Secreção traqueobrônquica; R: Resistente; S: Sensível; ND: não determinado; NE: não especificado.

MALDI-TOF MS

A confirmação da identificação bacteriana dos isolados de *A. baumannii* foi realizada através da técnica de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de Vôo/Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF MS). A extração

das proteínas ribossomais foi realizada após cultivo bacteriano em ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), segundo as recomendações do fabricante (MALDI Biotyper® Protocol Guide Edition 2, 2014 BRUKER). Após o processamento as amostras foram introduzidas no espectrômetro de massas Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), e identificadas pelo MALDI Biotyper RTC3. 3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

Extração do DNA total

O DNA total dos isolados de *A. baumannii* foi obtido utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado e analisado quanto ao grau de pureza utilizando o NanoDrop 2000.

Determinação da presença dos genes de virulência

A presença dos genes de virulência *pilA*, *csuE*, *ompA* e *basC* foi determinada através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando os primers descritos na tabela 2. As reações de PCR foram realizadas individualmente para cada gene utilizando um volume total de 25µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), 0,5µl de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato a 200 µM (GeHealthcare), 0,75 µl de MgCl₂ a 1,5 mM, 1µl de cada primer a 15 pmol/µl, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 59°C (gene *pilA*), 57°C (gene *csuE* e *ompA*) e 58°C (gene *basC*) para anelamento dos primers, acrescido de um minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C.

Determinação da presença dos genes de resistência

A determinação dos genes de resistência foi realizada através de PCR utilizando os primers descritos na tabela 2. A metodologia empregada nas amplificações dos genes de resistência foi a mesma utilizada nas amplificações dos genes de virulência, alterando apenas a temperatura de anelamento referente a cada gene analisado, incluindo 59°C para o gene *bla*_{OXA-51 like}, 56°C para o *bla*_{OXA-23 like}, 58 °C para *bla*_{OXA-143 like}, 54 °C para *bla*_{IMP}, 63°C para o *bla*_{VIM}, 66°C para o *bla*_{KPC}, 63°C para *bla*_{CTX-M} e 62°C para o *ISAba1*).

Tabela 2. Primers utilizados neste estudo para determinar por PCR a presença dos genes de resistência e virulência presentes em isolados de *A. baumannii*.

Gene	Nome do Primer	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>basC</i>	basC F	CATTGAGCGGAGTTTGCA	405	DORSEY et al., (2004)
	basC R	CGATTCAACTTCGCAGCT		
<i>ompA</i>	OmpAF	CAATTGTTATCTCTGGAG	952	TURTON et al. (2007)
	OmpAR	ACCTTGAGTAGACAAACGA		
<i>pilA</i>	pilAF	GGCAATTGCGATTCTGCTT	138	Proposto neste estudo
	pilAR	TGCAGCTGAACCATAGCGA		
<i>csuE</i>	CsuEF	ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC	580	TURTON et al. (2007)
	CsuER	CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG		
<i>bla</i> _{OXA-51 like}	OXA-51-like F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	WOODFORD et al.(2006)
	OXA-51-like R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>bla</i> _{OXA-23 like}	OXA-23-like F	GATCGGATTGGAGAACCGA	501	WOODFORD et al.(2006)
	OXA-23-like R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
<i>bla</i> _{OXA-143 like}	OXA-143-like F	TGGCACTTTTCAGCAGTTCCT	149	HIGGINS, LEHMANN, SEIFERT, (2010)
	OXA-143-like R	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>ISAba1</i>	ISAba1a	ATGCAGCGCTTCTTTGCAGG	389	MUGNIER et al., 2009
	ISAba1b	ATGATTGGTGACAATGAAG		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC 1F	GCTACACCTAGCTCCACCTTC	371	MOLAND (2003); YIGIT et al. (2001)
	KPC R	TATTTTCCGAGATGGGTGAC		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-DIA-F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	364	DONG et al. (2008)
	IMP-DIA-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-DIA-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	523	DONG et al. (2008)
	VIM-DIA-R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX - MA1	SCSATGTGCAGYACCAAGTAA	543	SALADIN et al., 2002
	CTX – MA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG		

Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com 2µl de Blue green (LGC Biotechnology).

Sequenciamento de DNA

Os genes de resistência e virulência de isolados representativos foram sequenciados (119, 113, 338, 570 e 808), utilizando os iniciadores descritos na tabela 2. Para seqüenciamento os amplicons foram purificados utilizando o PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

O seqüenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). A análise das seqüências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando os programas DNASTAR e BLAST no National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As seqüências dos genes *bla*_{OXA-51 like}, *bla*_{OXA-23 like}, *bla*_{OXA-143 like}, *ISAb_a1*, *csuE*, *ompA* e *BasC* estão disponíveis no Genbank database.

Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE)

Os 37 isolados de *A. baumannii* foram submetidos à avaliação do polimorfismo genético por PFGE, segundo o protocolo descrito Seifert et al., 2005, utilizando a enzima de restrição *Apal* (New England Biolabs, Inc). Os padrões do gel de PFGE foram comparados visualmente de acordo com critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995). A comparação foi realizada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice e dendograma formado pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), com o software BioNumerics versão 6.6, Applied Maths. Otimização: 0,8%, Tolerância 1,5%.

Resultados

Isolados Bacterianos

Todos os isolados do complexo *A. baumannii* utilizados neste trabalho tiveram sua identificação confirmada em sua totalidade como pertencentes à espécie *A. baumannii* através da técnica do Maldi-TOF e da verificação da presença do gene *bla*_{OXA-51-like}, gene intrínseco e naturalmente encontrado no cromossomo dessa espécie bacteriana.

Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE)

A análise da similaridade genética dos isolados de *A. baumannii* inclusos neste estudo foi realizada a partir da construção de um dendograma que permitiu agrupá-los em 7 genótipos distintos, apresentando similaridade genética > 80% aproximadamente, sendo denominados A (n=7), B (n=15), C (n=1), D (n=4), E (n=2), F (n=7) e G (n=1) (Figura 1), onde os *clusters* A, B, D, E e F apresentaram distintos subtipos.

Foi possível observar que o subtipo B3, considerado como indistinguível, foi encontrado disperso no hospital A (duas amostras, isoladas em setores distintos) e hospital B (um isolado).

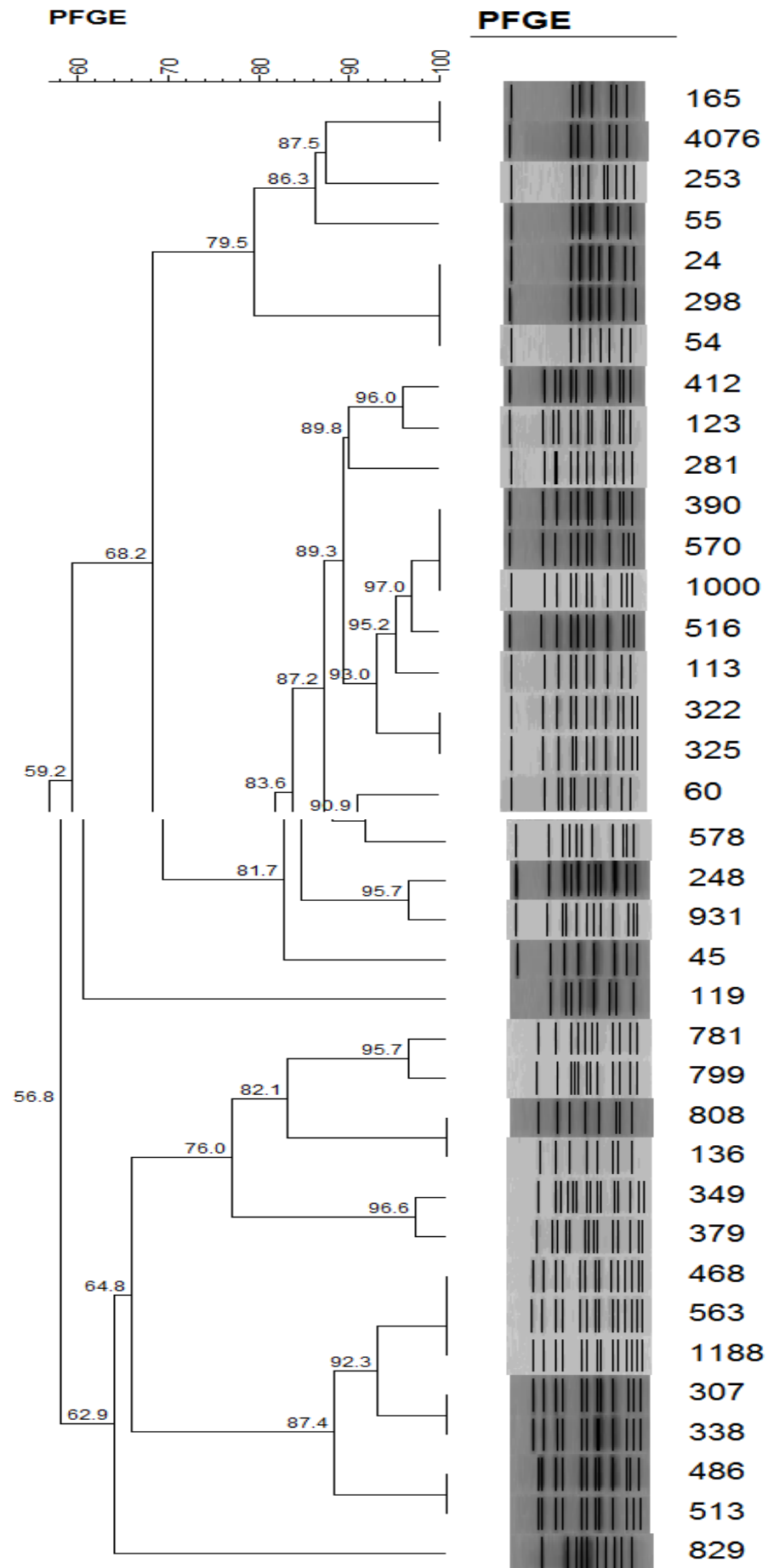


Figura 1. Polimorfismo genético de isolados de *A. baumannii* de pacientes atendidos em 2 hospitais de Recife - PE, detectado através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *Apa*I.

Determinação da presença e sequencia dos genes de resistência e virulência

Todos os isolados de *A. baumannii* analisados apresentaram o gene de resistência *bla*_{OXA-51-like}. O gene *bla*_{OXA-23-like} foi encontrado em apenas cinco isolados (13,51%), obtidos em apenas um hospital estudado, a partir de sítios corporais e setores hospitalares diferentes, tanto de IRAS como de colonização. Particularmente, o gene *bla*_{OXA-143-like} apresentou grande disseminação entre os isolados analisados, estando presente em aproximadamente 73% dos isolados obtidos em ambos hospitais, a partir de sítios corporais e setores hospitalares diferentes, tanto de IRAS como de colonização. O elemento de inserção *ISAba1* estava presente em aproximadamente 92% dos isolados obtidos nos dois hospitais analisados. Os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{CTX-M} não foram detectados em nenhum isolado de *A. baumannii*. Todos os isolados apresentaram os quatro genes de virulência pesquisados, incluindo *pilA*, *csuE*, *ompA* e *basC*, com exceção do isolado 829 que não apresenta o gene *csuE* (Tabela 3). O sequenciamento dos genes analisados nos isolados representativos confirmou a amplificação de todos os genes de resistência e virulência analisados neste estudo.

Tabela 3. Perfil de resistência e virulência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* inclusos neste estudo.

Hospital	Isolados	Perfil de Resistência	PFGE	β-lactamases Classe D e A				ISAb ₁	Metallo-β-lactamases		Genes de Virulência			
				<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{KPC}		<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>csuE</i>	<i>ompA</i>	<i>basC</i>	<i>pilA</i>
A	45	CTX, CPM, CAZ, CIP, GM, IMI, MEM, PRL	B ₁₁	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	113	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	B ₅	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	119	CFX, CFX/AX, MEM	C	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
A	123	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM	B ₁	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	136	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM, PRL	D ₂	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A	165	AMO/AC, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	A	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	248	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, MEM, PRL	B ₉	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	253	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM,	A ₁	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	281	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	B ₂	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	322	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT	B ₆	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	325	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT	B ₆	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	349	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, GM, IMI, MEM, PRL	E	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A	390	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	B ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	468	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	F	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	486	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	F ₂	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	513	CTX, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT	F ₂	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	516	AK, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	B ₄	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	563	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT	F	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	578	CTX	B ₈	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
A	781	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM	D	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A	799	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM	D ₁	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A	808	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, XFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM	D ₂	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+

A	829	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT	G	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
A	931	AK, SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, MEM, PRL	B ₁₀	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
A	1000	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	B ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	1188	SAM, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL	F	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A	4076	AK, CTX, CPM, CRO, CIP, GM, IMI, LEV, MEM, PRL, TN, TS	A	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	24	CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM	A ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	54	AK, SAM, CPM, CAZ, CRO, CIP, COL, GM, IMI, MEM	A ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	55	CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM	A ₂	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	60	CPM, CAZ, CRO, CIP, IMI, MEM	B ₇	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	298	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM	A ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	307	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM	F ₁	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	338	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM	F ₁	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	379	AK, CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM	E ₁	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	412	CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, IMI, MEM	B	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
B	570	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM	B ₃	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+

IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; CPM, Cefepima; CAZ, Ceftazidima; CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; AK, Amicacina; GM, Gentamicina; TN, Tobramicina; TS, Trimetoprim-Sulfametoxazol; COL, Colistina; PRL, Piperaciclina; SAM, Ampicilina-Sulbactam; CIP, Ciprofloxacino; LEV, Levofloxacino; AMO/AC, Amoxicilina/Ácido Clavulânico; CFX, Cefuroxima; CFX/AX, Cefuroxima/Axetil; NFT, Nitrofurantoína.

Discussão

O reconhecimento de *A. baumannii* como patógeno MDR capaz de sobreviver em ambientes hostis por ser resistente à dessecação, vem sendo cada vez mais consolidado cientificamente. Esta característica é ainda agravada pela habilidade desta espécie bacteriana em acumular determinantes genéticos de resistência e virulência, devido sua competência natural para aquisição de material genético, possibilitando a permanência desse patógeno no ambiente hospitalar, particularmente em UTIs, por serem ambientes favoráveis à surtos (EIJKELKAMP et al., 2011; AGODI et al., 2014).

A dificuldade no controle da transmissão de isolados de *A. baumannii* MDR, dentro e entre hospitais, tem se tornado um fardo para o monitoramento das infecções causadas por esse patógeno (CHANG et al., 2013). Neste estudo, foi possível detectar isolados, pertencentes a um mesmo genótipo, em setores diferentes de um mesmo hospital, assim como, isolados indistinguíveis geneticamente obtidos em estabelecimentos de saúde distintos, independente a que sítio de infecção foram obtidos. Estes dados sugerem disseminação intra e inter-hospitalar de isolados de *A. baumannii* com o mesmo padrão genético em Recife-PE.

A disseminação inter-hospitalar de isolados de *A. baumannii* tem sido relatada em outros estudos. No trabalho de Atrouni et al. (2016) isolados de *A. baumannii* com padrão genético indistinguível foram obtidos de unidades de saúde distintas, indicando uma possível transmissão inter-hospitalar. Mahamat et al. (2016), realizaram o primeiro estudo com dados clínicos e moleculares de isolados de *A. baumannii* num hospital da Guiana Francesa, onde seis perfis de PFGE foram encontrados, sugerindo uma disseminação clonal e possivelmente uma endemia de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos na UTI desta instituição hospitalar.

O desafio no tratamento de infecções por *A. baumannii* é atribuído principalmente à classe de enzimas oxacilinasas, que possuem habilidade de hidrolisar carbapenêmicos, com a transferência desses genes através de transposons, possibilitando a predominância deste mecanismo de resistência em isolados de *A. baumannii* assim como de *Enterobacteriaceae* (EVANS, AMYES, 2014). As enzimas OXA quando super expressas devido a presença do elemento de inserção, *ISAba1*, um forte promotor transcricional, adquirem um potencial de

resistência a carbapenêmicos aumentado (TURTON et al., 2006; HOWARD et al., 2012; VALI et al., 2015). No presente trabalho 94% dos isolados de *A. baumannii* apresentaram o elemento de inserção *ISAbal*, encontrados tanto em isolados que possuíam um único gene codificante de oxacilinase (*bla_{OXA-51-like}*), como nos que apresentavam também outros genes (*bla_{OXA-143-like}* e/ou *bla_{OXA-23-like}*).

Em nossos estudos, todos os isolados de *A. baumannii* apresentaram o gene *bla_{OXA-51-like}*, corroborando com a realização da detecção desse gene como ferramenta auxiliar para a confirmação desta espécie bacteriana (HOWARD et al., 2012, ELABD et al., 2015, AHMED et al., 2016). No entanto, o aparecimento de plasmídeos carregando os genes *ISAbal-bla_{OXA-51-like}* em *Acinetobacter nosocomialis* colocam em dúvida a utilização da detecção do gene *bla_{OXA-51-like}* como ferramenta para diferenciar *A. baumannii* de outras espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (LEE et al., 2012).

As β -lactamases de classe D (CHDLs) como OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 e OXA-235 estão relacionadas à resistência a carbapenêmicos, além das carbapenemases de classe B e A (ATROUNI et al., 2016). Neste estudo, detectamos a presença dos genes *bla_{OXA-23-like}* e *bla_{OXA-143-like}*, entre os isolados analisados, com o gene *bla_{OXA-143-like}* particularmente presente em mais de 70% dos isolados, obtidos em ambos hospitais analisados, sendo encontrado também associado a mais um gene codificante de oxacilinasas com atividade carbapenemase, o *bla_{OXA-23-like}*. Estes dados demonstram uma grande disseminação de genes de resistência entre os isolados analisados, obtidos de diferentes setores e unidades hospitalares, envolvidos com IRAS ou obtidos a partir de colonização.

Um dos principais fatores de virulência presentes na maioria dos isolados de *A. baumannii*, é relacionado a capacidade de formar biofilme proporcionando uma maior permanência dessa bactéria em ambientes hospitalares e resistência a antibióticos, exigindo uma variedade de determinantes de virulência para sua formação (LONGO, VUOTTO, DONELLI, 2014; THUMMEEPK et al., 2016). A presença dos genes *csuC* e *csuE*, que pertencem a loci bacteriano relacionado com a secreção e montagem de pili, estão envolvidos no processo inicial que leva a formação de biofilme em cepas ATCC 19606 de *A. baumannii* (TOMARAS et al., 2003). No trabalho de Gurung et al. (2013), isolados de *A. baumannii* que produziram biofilmes foram mais resistentes a antimicrobianos do que isolados não produtores. No entanto, nos estudos de Espinal, Marti e Vila (2012), cepas

formadoras de biofilme foram menos resistentes a quase todos os antimicrobianos do que as cepas que não formaram biofilme, sendo estas últimas resistentes à piperacilina, ceftazidima, cefepima, ciprofloxacino, gentamicina e tobramicina. Os isolados de *A. baumannii* deste trabalho, com exceção do isolado 829 apresentaram o gene *csuE*, podendo serem envolvidos na constituição do sistema pili e consequente na formação de biofilme, uma vez que a inativação do gene *csuE* incapacita isolados bacterianos quanto a produção de pili, por conseguinte, aderência celular e formação de biofilme (ESPINAL, MARTÍ, VILA, 2012).

A expressão de pili junto com a mobilidade “twitching” favorece a aderência de *A. baumannii* a superfícies abióticas e na formação de biofilme mais precocemente (LUO et al., 2015). O sistema de pili tipo IV é constituído por muitas proteínas sendo rearranjadas como apêndices nas superfícies de muitas bactérias gram-negativas. Inclui-se também o composto subunidade de pilina principal, *pilA*, e de pilinas menores abundantes dentro do pilus (HARDING et al., 2013). Neste estudo, todos os isolados de *A. baumannii*, apresentam o gene *pilA*, aumentando a probabilidade de mobilidade deste patógeno, um fator adicional à patogenicidade dessa espécie. Harding et al. (2013) observaram que a motilidade de superfície não depende, necessariamente, dos produtos do genes envolvidos na formação do pili tipo IV. Clemmer et al. (2012), observaram que a inativação de alguns genes diminuíram a motilidade e, esses genes não faziam parte do sistema de pili tipo IV, questionando a existência de um outro mecanismo.

Um dos fatores de virulência mais bem caracterizados em isolados de *A. baumannii* é a proteína *OmpA*, a proteína de superfície mais abundante neste patógeno estando envolvida em vários processos, incluindo indução a apoptose celular, aderência e invasão à células epiteliais, auxílio à permanência e crescimento do isolado em soro humano além de contribuição para sobrevivência dos isolados de *A. baumannii* através da formação de biofilme, podendo servir como alvo estratégico para o combate à patogênese de *A. baumannii* (HOWARD et al., 2012; MCCONNELL et al., 2013). Neste estudo todos os isolados de *A. baumannii* apresentam o gene *ompA*.

A competência de isolados de *A. baumannii* para colonizar e invadir hospedeiros humanos indicam que esses isolados conseguem adquirir elementos essenciais, como o ferro, durante o processo de infecção (DORSEY et al., 2004). Na escassez de ferro, as bactérias produzem e secretam quelantes altamente

específicos para o íon ferro, os sideróforos. Um dos sideróforos produzidos por *A. baumannii* é a acinetobactina (MIHARA et al., 2004). Bactérias patogênicas, geralmente, abrigam em seu genoma genes envolvidos na biossíntese e captação de sideróforos, onde seus produtos são diretamente relacionados a virulência dessas bactérias. No sistema de aquisição de ferro, a primeira etapa é a biossíntese da acinetobactina, realizado pelas proteínas codificadas pelos genes *basA*, *basB*, *basC*, *basD*, *basF*, *basG*, *basH*, *basI*, and *basJ* (EIJKELKAMP et al., 2011, HASAN, CHOI, OH, 2015). Neste estudo, todos os isolados de *A. baumannii* possuem o gene *basC*.

A grande maioria dos isolados apresentaram todos os genes de virulência pesquisados com pelo menos dois genes de resistência relacionados à produção de oxacilinas, além do elemento de inserção *ISAba1*. Apesar da similaridade genética quanto aos genes de resistência e virulência analisados neste estudo, os isolados obtidos em setores de isolamento diferentes a partir de colonização e sítios de infecção diversos, puderam ser agrupados em sete clusters a partir dos padrões de PFGE obtidos. Adicionalmente, foi possível identificar isolados geneticamente indistinguíveis em diferentes setores do mesmo hospital, assim como em unidades hospitalares diferentes, demonstrando uma ampla disseminação tanto de genes de resistência e virulência entre ambientes e unidades hospitalares diferentes, como também de isolados geneticamente indistinguíveis, carreando importantes genes de resistência e virulência.

O controle de IRAS causadas por isolados de *A. baumannii* MDR é relacionado a vigilância molecular local visando estabelecer conhecimento que permita evitar a transferência de material genético entre patógenos endêmicos (ELABD et al., 2015). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram uma ampla disseminação de genes de resistência e virulência entre isolados de *A. baumannii* em Recife-PE, além de uma grande dispersão clonal destes isolados em ambos hospitais analisados e em seus diferentes setores. Este trabalho ressalta a importância do estudo epidemiológico de isolados de *A. baumannii* que são responsáveis por IRAS, permitindo a avaliação quanto a disseminação desses patógenos em unidades distintas, além do conhecimento dos mecanismos de resistência e virulência presentes nesses isolados, possibilitando melhoria no direcionamento da escolha terapêutica no combate à infecções causadas por *A.*

baumannii e do alerta aos setores de vigilância hospitalar para futuras políticas de controle de infecções hospitalares mais rigorosas

Agradecimentos

Agradecemos a equipe do Laboratório ALERTA/UNIFESP pelo suporte na execução das técnicas de MALDI-TOF MS e PFGE, além de ceder a cepa de referência de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Agradecemos também ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz pelo suporte na execução da técnica de sequenciamento.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesses na execução do corrente trabalho.

Referências

AGODI, A. et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v.86, p. 260-266, 2014.

AHMED et al. Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. [European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases](#), v.35, p. 1463-1468, 2016.

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

ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, p. 292-301, 2014.

BLANCO-LOBO, P. et al. Clinical validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Acinetobacter baumannii* colonization. **Journal of Hospital Infection**, p.1-4, 2016.

BERGOGNE-BEREZIN, E., TOWNER, K. J. American Society for Microbiology *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p. 148-165, 1996.

BISWAS, I Genetic tools for manipulating *Acinetobacter baumannii* genome: an overview. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 657-669, 2015.

BOUCHER, H. W. et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: Na Update From the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases Advance Access**, p. 1-10, 2013.

CHANG, K. et al. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.46, p. 195-201, 2013.

CHEN, W. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.11, p. 2495-2500, 2015.

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

DORSEY, C. W. et al. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. **Microbiology**, v.150, p. 3657-3667, 2004.

EIJKELKAMP, B. A. et al. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. **BioMed Central Genomics**, v. 12, p. 2-14, 2011.

ELABD, F. M. et al. Molecular characterization of oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolates in a Saudi hospital. **Journal of Infection and Public Health**, v.8, p.242-247, 2015.

ESPINAL, P., MARTI, S., VILA, J. Effect of formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v.80 p.56-60, 2012.

EVANS, B. A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. The Rise of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p. 223-238, 2013.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 241-263, 2014.

GALES, A. C. et al. Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 104-113, 2001.

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 Journal of Critical Care Medicine](#), v.17, p.214-218, 2003.

HARDING, C. M. et al. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not Surface-Associated Motility. **mBIO**, v.4, p.1-10, 2013.

HASAN, T., CHOI, C. H., OH, M. H. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. **Genomics & Informatics**, v.13, p. 2-6, 2015.

HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v.3, p. 243–250; 2012.

LEE, Y. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a *bla*OXA-51-Like Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p. 1124–1127, 2012.

LIN, M. et al. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1-8, 2015.

LONGO, F., VUOTTO, C., DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiologica**, v.37, p.119-127, 2014.

LUO, L. et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. **BioMed Central Microbiology**, v.15, p. 1-7, 2015.

MA, Z. et al. Investigation on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.8, p. 4429-4432, 2015.

MAGALHÃES, V. D. et al. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, p. 155-161, 2005.

MAHAMAT, A. et al. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008–2014. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.48, p. 51-55, 2016.

MCCONNELL, M. J. et al. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. [FEMS Microbiology Reviews](#), v.37, p. 130-155, 2013.

MIHARA, K. et al. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. **Microbiology**, v.150, p. 2587-2597, 2004.

NIGRO, S. J., HALL, R. M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.71, p. 1135-1147, 2016.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 538–582, 2008.

PIEPENBRINK, K. H. et al. Structural Diversity in the Type IV Pili of Multidrug-resistant *Acinetobacter* **The Journal Biological Chemistry**, p. 1-24, 2016.

POTRON, A., POIREL, L., NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* : Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.45, p.568-585, 2015.

RYU, S. Y., BAEK, W., KIM, H. A. Association of biofilm production with colonization among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **The Korean Journal of Internal Medicine**, p.1-7, 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. **National Academic of Sciences**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SEIFERT, H. et al. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 4328–4335, 2005.

SELASI, G. N. Differences in Biofilm Mass, Expression of Biofilm-Associated Genes, and Resistance to Desiccation between Epidemic and Sporadic Clones of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 191. **Plos One**, v.13, p. 1-13, 2016.

TALBOT, G. H. et al. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 657-668, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Jornal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 2233-2239, 1995.

THUMMEEPK, R. et al. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **International Microbiology**, v.19, p. 121-129, 2016.

TURTON, J. F. et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, p. 72-77, 2006.

VALI, L. et al., Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait, **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-8, 2015.

VIJAYKUMAR, S., BALAJI, V., BISWAS, I. Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* Strain B8300, Which Displays High Twitching Motility. **Genome Announcements**, v.3, p.1-2, 2015.

ARTIGO 2 – Submetido a Journal of medical microbiology

Expressão de genes de virulência em isolados multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* submetidos à colistina e meropenem

Introdução

Isolados de *Acinetobacter baumannii* possuem resistência intrínseca a várias classes de antimicrobianos, com notável habilidade em adquirir vários determinantes de resistência a antibióticos, tornando esta espécie um dos maiores desafios para o êxito das terapias atuais (HENRY et al., 2015; DOI, MURRAY, PELEG, 2015). Com a escassez de novas drogas para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, as infecções causadas por *A. baumannii* multidroga resistente (MDR) são de grande preocupação pela dificuldade no tratamento, além da existência de relatos do crescimento de resistência em isolados de *A. baumannii* extensamente resistentes a drogas (XDR) e pan-resistentes, principalmente em unidades de terapia intensiva (LÓPEZ-ROJAS et al., 2011; HENRY et al., 2015; LAISHRAM et al., 2016).

Com o passar dos anos o aumento da aquisição de mecanismos de resistência à várias classes de antibióticos disponíveis por isolados de *A. baumannii*, resultou na eliminação dos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos, acarretando escassez de opções terapêuticas eficazes para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*. (BUSH, 2012; CAI et al., 2012; EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; LANNAN et al., 2016). Quando o tratamento com carbapenêmicos e aminoglicosídeos não são eficazes, as polimixinas são a opção terapêutica indicada, incluindo a polimixina B e a colistina (ZAVASCKI et al., 2007; NATION, LIN, 2009; CHEAH et al., 2016), permanecendo como último recurso para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR (BISWAS et al., 2012; OLAITAN, MORAND, MARCROLAIN, 2014). No entanto, a monoterapia utilizando colistina pode levar ao rápido surgimento de resistência em patógenos gram-negativos, incluindo *A. baumannii* (TAN; LI; NATION, 2007; HENRY et al., 2015). Dentre várias recomendações e diretrizes mundiais quanto a esta situação, vem sendo proposto o uso de combinações efetivas de antimicrobianos (BUSH et al., 2011), possibilitando o uso associado de diferentes classes de antimicrobianos incluindo meropenem e colistina (ZUSMAN et al., 2013; PAUL et al., 2014;

LENHARD et al., 2016). A recomendação do tratamento dessas infecções consiste na utilização de uma dose farmacocineticamente otimizada de colistina com ou sem uma segunda droga, geralmente um carbapenêmico, tigeciclina ou sulbactam (DOI, MURRAY, PELEG, 2015).

Devido ao escasso número de antimicrobianos em última etapa de desenvolvimento clínico, brevemente nenhuma opção terapêutica para tratamento de infecções reincidentes por diversos patógenos MDR, incluindo *A. baumannii*, estará disponível (CHEAH et al., 2016).

Além da resistência a múltiplas classes de antimicrobianos isolados bacterianos MDR podem apresentar fatores de virulência que possibilitam a sua sobrevivência mesmo quando submetidas ao tratamento com antimicrobianos. Já tem sido descrito na literatura vários fatores de virulência em isolados de *A. baumannii*, entre eles, aumento da capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas, motilidade, captação de elementos genéticos móveis, tolerância à dessecação, sobrevivência por longos períodos de tempo em superfícies e equipamentos hospitalares e proteção ao estresse à cápsula polissacarídica (EIJKELKAMP et al., 2011; ESPINAL, MARTÌ, VILA, 2012; EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; ALIRAMEZANI et al., 2016).

A formação de biofilme é um dos mais importantes fatores de virulência para as bactérias. O biofilme é constituído por uma matrix polimérica que envolve as bactérias e está associado com a sobrevivência, virulência e comunicação bacteriana, contribuindo para sua proteção em ambientes hostis durante infecção ao hospedeiro e também possibilitando sua permanência em superfícies abióticas (ESPINAL, MARTÌ, VILA, 2012; LUO et al., 2015). Funciona também como um mecanismo de evasão das bactérias à resposta imune do hospedeiro (BREIJ et al., 2009). Em *A. baumannii*, o estágio inicial para a formação de biofilme em superfícies abióticas depende da formação do *pili*, codificado pelo complexo de proteínas chaperonas *csuA/BABCDE*, controlado pelo sistema regulatório de dois componentes codificados pelos genes *bfmS* e *bfmR*, onde a expressão do operon *csu* e a expressão dos genes *csuC* e *csuE* estão envolvidos na aderência inicial à superfícies durante a formação de biofilme (LUO et al., 2015; LANNAN et al, 2016). O estudo de Liou et al. (2014) foi o primeiro a demonstrar que a inativação do gene *bfmS* na cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* resultou na formação deficiente de

biofilme em superfícies abióticas, na redução de aderência à células eucarióticas e na sensibilização à morte sérica.

Com habilidade para se proteger dos fatores de agressão externos como: variações de temperatura, pH, osmolaridade, exposição a compostos tóxicos e estresse oxidativo, as bactérias gram-negativas impulsionam o desenvolvimento de mecanismos de resposta a esses estímulos através do sistema de regulação BaeSR, facilitando mudanças na expressão gênica (LEBLANC et al., 2011). Sua principal função é a super expressão da bomba de efluxo em resposta a agentes que danificam o envelope bacteriano (LEBLANC et al., 2011; LIN et al., 2015).

Considerando que a eficácia de um ou de uma combinação de agentes antimicrobianos é relacionada não só a sua atividade bactericida ou bacteriostática mas também ao impacto na expressão da virulência bacteriana e assim na fase inicial e de manutenção da infecção, o presente estudo verificou a expressão dos genes *baeS*, *bfmS* e *csuE* quando submetidos ao tratamento *in vitro* com meropenem e colistina isoladamente e em combinação.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Os isolados de *A. baumannii* analisados neste estudo foram selecionados quanto aos seguintes critérios: pertencerem a perfis genéticos distintos (PFGE), presença de um ou mais genes de resistência para β -lactamases; presença do elemento de inserção *ISAba1*; e presença dos genes de virulência *csuE*, *baeS* e *bfmS*. Três isolados foram então selecionados, os quais foram obtidos por demanda espontânea de dois hospitais públicos da cidade de Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014 (Dados não publicados).

Tabela 1. Perfil de resistência e virulência dos isolados de *A. baumannii* analisados deste estudo.

Isolado	Hospital	PFGE	Virulência	Resistência
54	B	A3	<i>csuE</i> , <i>ompA</i> , <i>basC</i> , <i>pilA</i> , <i>baeS</i> , <i>bfmS</i>	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-143-like} , <i>ISAba1</i>
113	A	B5	<i>csuE</i> , <i>ompA</i> , <i>basC</i> , <i>pilA</i> , <i>baeS</i> , <i>bfmS</i>	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>ISAba1</i>

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos isolados bacterianos de *A. baumannii* para o meropenem e a colistina foram determinadas pelo teste de microdiluição em caldo, utilizando caldo Mueller-Hinton cátion ajustado, utilizando a cepa de referencia ATCC 25922 de *Escherichia coli* como controle de qualidade, segundo recomendações e critérios interpretativos do CLSI, 2013.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Três isolados selvagens e a cepa ATCC 19606 de *A. baumannii* foram submetidos a sub-CIMs de meropenem e colistina, isoladamente e em associação, por 6 horas, de acordo com a CIM apresentado por cada isolado bacteriano (tabela 2). Cada experimento tinha um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença dos antimicrobianos. O RNA total foi extraído segundo protocolo descrito por Sambrook; Russell, 2001. A concentração do RNA foi determinada em Nanodrop 2000 e a integridade e pureza por eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA extraído foi tratado com DNase (SIGMA ALDRICH) segundo instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLVRT (200 U/μl) (PROMEGA) e Randon Primer (0,5 ug/μl) (PROMEGA), segundo instruções do fabricante.

Tabela 2 – CIM, Sub-CIM e expressão dos genes de virulência, *csuE*, *bfmS* e *baeS* em isolados de *Acinetobacter baumannii*

Isolados	Meropenem						Colistina				Associação		
	CIM	SC	Expressão			MIC	SM	Expressão			Expressão		
			<i>csuE</i>	<i>bfmS</i>	<i>baeS</i>			<i>csuE</i>	<i>bfmS</i>	<i>baeS</i>	<i>csuE</i>	<i>bfmS</i>	<i>baeS</i>
808	64	8	-0,6	NI	1,27	16	1	NI	NI	6,9	3,7	NI	2,14
54	64	8	NI	NI	NI	4	1	0,75	5,33	3,1	NI	NI	1,96
113	2	0,25	-1,3	4,4	NI	2	0,25	NI	9,6	NI	NI	2,6	0,9
ATCC 19606	0,125	0,0625	-0,59	NI	NI	2	0,5	NI	NI	NI	3,2	4,13	NI

Fonte: Autor, 2016; CIM: Concentração Inibitória Mínima; SC: Sub-CIM; NI: Não interferiu significativamente.

Determinação da expressão dos genes de virulência pela técnica de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o SYBR Green RT-PCR Kit (Applied Biosystems) utilizando primers específicos para cada gene alvo analisado, incluindo o *csuE*, *bfmS* e *baeS* (tabela 3). O gene *gyrB* foi escolhido como gene de referência para todas as reações de RT-qPCR uma vez que apresentou a menor variabilidade entre as condições testadas. Reações sem Transcriptase Reversa foram utilizadas como controles negativos, sendo consideradas negativas as reações com dez ciclos de diferença das reações contendo a Transcriptase. As curvas de *melting* foram utilizadas para verificar a amplificação de um fragmento único. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. O método de expressão relativa foi utilizado para determinar os níveis de expressão do genes e a análise dos dados foi realizada a partir do programa Series Rotorgene Q. software 1.7 e a análise estatística com o One Way ANOVA, seguido de teste de Dunnett com $p < 0.05$. Os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Tabela 3. Primers utilizados nas reações de RT-qPCR para análise de expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS*, *baeS*, e do gene normalizador *gyrB*.

Gene	Primer	Sequência de primers (5' → 3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>csuE</i>	<i>csuE_F</i>	GCTTGGCTTTAGCAAACATGACC	194	Luo et al., 2015
	<i>csuE_R</i>	ATTGCCATCAGGCCCGCTA		
<i>bfmS</i>	<i>bfmS_F</i>	ACCGCCCGTAATCCGAAC	127	Luo et al., 2015
	<i>bfm_R</i>	TGAACTTATTCCACCGCCTTTA		
<i>baeS</i>	<i>baeS_F</i>	CATTCTTTTCGATGAACACACTCTCA	133	Henry et al., 2015
	<i>baeS_R</i>	CTTCAAATGGTTGATATTCCGAAGG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB_F</i>	CGAGGGTGACTCAGCGGGTG	101	Henry et al., 2015
	<i>gyrB_R</i>	GCGCACGCTCAACGTTTCAGG		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB_F</i>	AGTCACGCGAAGTTGAAGGT	188	Henry et al., 2015
	<i>rpoB_R</i>	AGCACGCTCAACACGAAGTA		

RESULTADOS

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

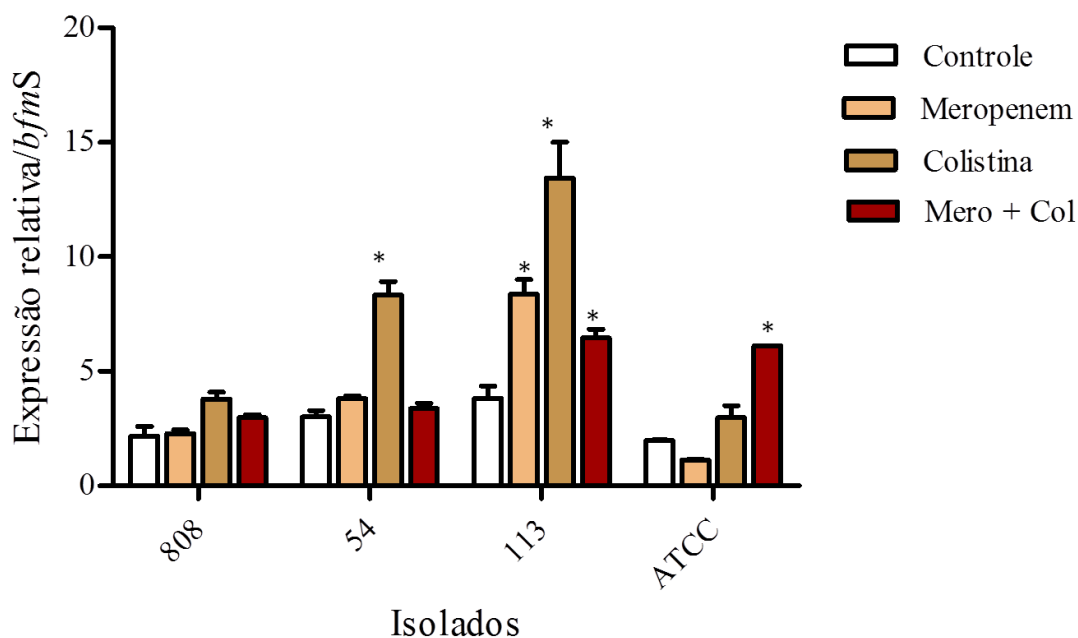
Os isolados analisados 54 e 808 apresentaram resistência ao meropenem, enquanto o isolado 113 foi sensível a este antimicrobiano. Em relação à colistina, o isolado 113 apresentou-se sensível, no entanto, os isolados 54 e 808 apresentaram-se resistentes. A cepa de referência ATCC 19606 de *A. baumannii* apresentou sensibilidade ao meropenem e a colistina com MIC correspondente ao intervalo proposto pelo CLSI, 2016 (tabela 3).

Efeito dos antimicrobianos na expressão do gene *bfmS*

O meropenem não interferiu na expressão do gene *bfmS* nos dois isolados resistentes (54 e 808) e na cepa ATCC 19606 sensível a este antimicrobiano. No entanto, no isolado sensível (113) aumentou 4,4 vezes a expressão deste gene de virulência em relação ao controle (Figura 1). A colistina aumentou em 5,33 e 9,6 vezes a expressão do gene *bfmS* nos isolados 54 (resistente) e 113 (sensível) de *A. baumannii*, respectivamente. A colistina não interferiu na expressão do gene *bfmS* na cepa ATCC 19606 e no isolado 808 resistente à colistina.

A associação do meropenem e colistina aumentou a expressão do gene *bfmS* nos isolados sensíveis 113 e ATCC 19606, em 2,6 e 4,13 vezes, respectivamente. Este tratamento, no entanto, não interferiu na expressão do gene *bfmS* nos isolados resistentes 808 e 54.

Figura 1. Expressão relativa do gene *bfmS* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina.

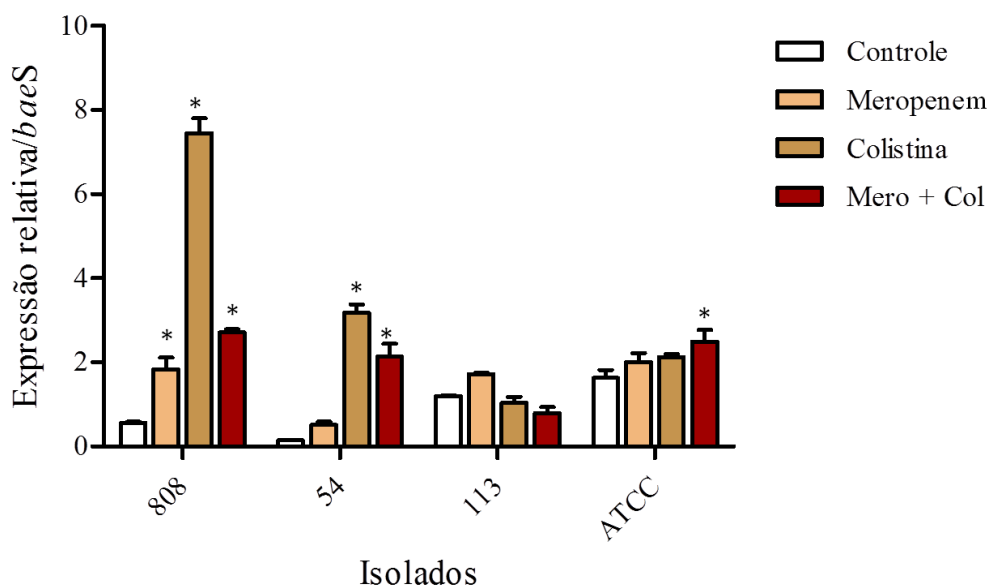


Fonte: Autor, 2017. Nota: Associação: meropenem + colistina. A expressão relativa foi normalizada com o gene *gyr B*. As barras representam Média $\pm$ DP. Asterisco representa significância estatística de $p < 0.05$.

Efeito dos antimicrobianos na expressão do gene *baeS*

O tratamento com meropenem não interferiu na expressão do gene *baeS* nos isolados sensíveis e em um dos isolados resistentes a este antimicrobiano (54). No entanto, o aumento de 1,27 vezes na expressão do gene *baeS* foi observado no isolado resistente 808. O tratamento com a colistina induziu um aumento na expressão do gene *baeS* nos isolados resistentes a esse antimicrobiano, ocorrendo aumento de 6,9 vezes no isolado 808 e 3,1 vezes no isolado 54 em relação ao grupo controle, não sendo, no entanto, observada alteração na expressão deste gene nos isolados sensíveis a esse antimicrobiano (isolado 113 e cepa ATCC 19606). Quando submetidos à associação dos antimicrobianos meropenem e colistina os isolados 808, 54 e a ATCC 19606 apresentaram aumento da expressão do gene *baeS*, de 2,14, 1,96 e 0,9 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente. A associação dos antimicrobianos não alterou a expressão do gene *baeS* em apenas um isolado analisado (113).

Figura 2. Expressão relativa do gene *baeS* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina.

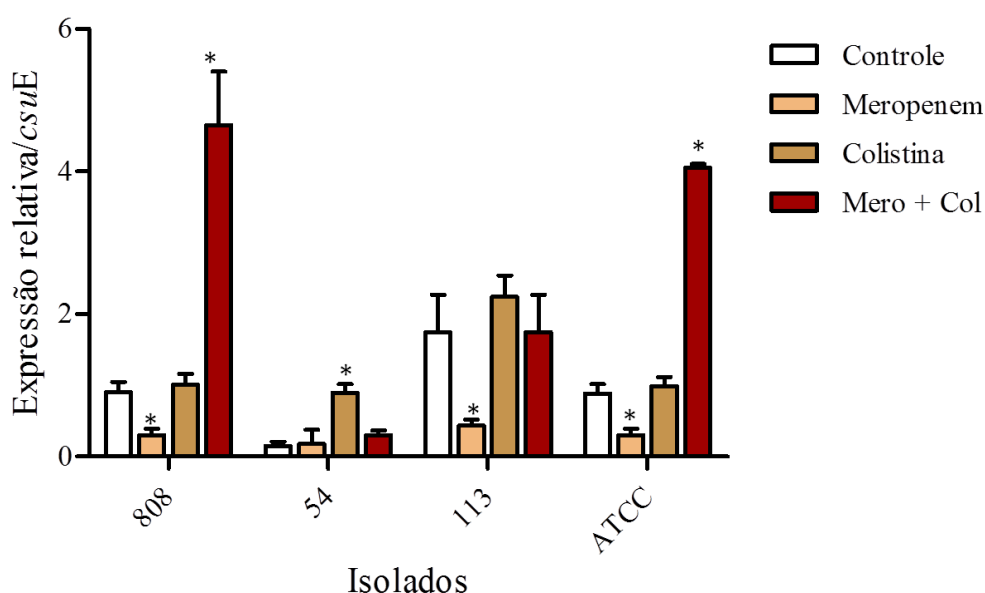


Fonte: Autor, 2017. Nota: Associação: meropenem + colistina. A expressão relativa foi normalizada com o gene *gyr B*. As barras representam Média $\pm$ DP. Asterisco representa significância estatística de $p < 0.05$.

Efeito dos antimicrobianos na expressão do gene *csuE*

A submissão dos isolados ao meropenem diminuiu a expressão do gene *csuE* em 0,6, 1,3 e 0,59 vezes nos isolados 808, 113 e ATCC 19606, respectivamente, não interferindo no entanto, em um dos isolados resistentes (54). A colistina induziu um aumento na expressão do gene *csuE* de 0,75 vezes em um dos isolados resistentes a este antimicrobiano (54), não alterando significativamente, no entanto, a expressão deste gene de virulência nos demais isolados analisados. Quando submetidos ao tratamento com associação (mero+col), observou-se um aumento de 3,7 vezes na expressão do gene *csuE* no isolado 808 e 3,2 vezes na cepa ATCC 19606, mantendo-se inalterada a expressão deste gene de virulência nos demais isolados analisados.

Figura 3. Expressão relativa do gene *csuE* após submissão aos antimicrobianos meropenem, colistina e associação de meropenem e colistina.



Fonte: Autor, 2017. Nota: Associação: meropenem + colistina. A expressão relativa foi normalizada com o gene *gyrB*. As barras representam Média $\pm$ DP. Asterisco representa significância estatística de $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

As infecções bacterianas são uma das principais causas de morte em todo o mundo e a diminuição de opções terapêuticas aumenta os riscos associados aos cuidados de saúde básicos e cirurgias (KROGER et al., 2017). A emergência contínua de microrganismos fenotipicamente resistentes a múltiplos antimicrobianos traz um fardo econômico importante, levando a necessidade da introdução de novos antimicrobianos no mercado ou de novas estratégias terapêuticas, incluindo o uso associado de antimicrobianos.

A eficácia clínica de um agente antimicrobiano é, no entanto, relacionada não só a atividade antimicrobiana, mas também ao impacto de seu uso na expressão da virulência bacteriana (STEVENS et al., 2007). Vários trabalhos vem demonstrando alterações na expressão de genes de virulência importantes em espécies bacterianas gram-positivas e gram-negativas de importância médica, incluindo isolados de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Acinetobacter baumannii*, quando submetidos a diferentes antimicrobianos utilizados clinicamente (YUHAN et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; REITER; LAMAS et al., 2016; SAN'ANNA; D'AZEVEDO, 2014; OTTO et al., 2013), o que pode resultar na alteração da patogênese bacteriana e consequentemente no agravamento ou atenuação do processo infeccioso (CARDOSO et al., 2016; STEVENS et al., 2007).

Neste estudo três isolados clínicos e a ATCC 19606 de *A. baumannii* foram analisados quanto à expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS* e *baeS*, quando submetidos a antimicrobianos de última escolha para tratamento de IRAS causadas por isolados MDR, incluindo meropenem, colistina e a associação destes antimicrobianos. Em nossas análises apenas o tratamento com meropenem foi capaz de diminuir a expressão de apenas um dos genes de virulência analisados, o *csuE*. A família de genes *csuA/BABCDE* codificam proteínas chaperonas envolvidas no sistema de secreção para produção e montagem do pili bacteriano, o que contribui para aumento de adesão bacteriana em superfícies bióticas e abióticas e também nas etapas iniciais da formação de biofilme (EIJKELKAMP et al., 2011; AZIZI et al., 2016). A diminuição da expressão do gene *csuE*, devido o tratamento único com meropenem em isolados de *A. baumannii*, sugere modulação deste gene de virulência nos isolados analisados, o que poderia contribuir diminuindo o poder de

adesão bacteriana, e conseqüentemente, nas etapas iniciais do processo infeccioso e formação de biofilme. No entanto, a modulação deste gene de virulência não foi observada no uso associado do meropenem e colistina.

O tratamento de IRAS causadas por isolados MDR de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos é comumente conduzido pelo uso associado de agentes antimicrobianos, incluindo um carbapenêmico e uma polimixina. O uso do meropenem e da colistina vem sendo recomendado em alguns estudos, devido à evidências de sinergia na atividade antimicrobiana dos agentes utilizados associadamente (CAI et al., 2012; ZUSMAN et al., 2013; LENHARD; NATION; TSUJI, 2016). Neste estudo a submissão dos isolados à colistina, meropenem e a associação destes agentes antimicrobianos foi capaz de modificar a expressão dos três genes de virulência estudados em relação ao controle, apresentando uma tendência ao aumento da expressão dos genes estudados.

O sistema de dois componentes é um sistema de transdução de sinal muito importante para adaptação a mudanças drásticas e imediatas em condições ambientais externas ou internas bacterianas (SUN et al., 2012). O BfmRS é um sistema de dois componentes (TCS) encontrado em isolados de *A. baumannii* que controla a formação de biofilme e a morfologia celular. Através da regulação de transcrição, ativa a expressão do sistema de montagem das chaperonas responsáveis pela produção de pili necessários para a formação de biofilme (LUO et al., 2015). Além de contribuir para a virulência bacteriana, o sistema BfmRS parece também estar envolvido com a resistência bacteriana, onde a inativação do *bfmS* poderia alterar os MICs para diferentes antimicrobianos, incluindo a ciprofloxacina e o imipenem (LIOU et al., 2014). Neste estudo, o tratamento com colistina, meropenem e sua associação foi relacionada ao aumento da expressão do gene *bfmS* na maioria dos isolados analisados, o que pode estar relacionado a modificações bacterianas resultantes das alterações ambientais promovidas pela presença dos antimicrobianos, podendo alterar a resistência e a virulência bacteriana.

Semelhante ao BfmRS, o TCS BaeSR pode detectar sinais ambientais e assim responder alterando o envoltório bacteriano respondendo não só ao estresse osmótico elevado mas também influenciando a susceptibilidade à antimicrobianos, como a tigeciclina em isolados de *A. baumannii*, através da regulação positiva dos genes da bomba de efluxo RND *adeA* e *adeB*, contribuindo também na eliminação

de outros produtos químicos (LIN;LIN;LAN, 2015). A expressão do gene *baeS* foi significativamente aumentada na maioria dos isolados analisados quando submetidos à colistina e à associação dos antimicrobianos. O aumento da expressão do gene *baeS* foi anteriormente relatado em estudo recente, realizado por Henry et al., 2015, onde os autores puderam relacionar ao aumento da expressão deste gene de virulência ao tratamento com a colistina, o que estaria relacionado ao aumento simultâneo da expressão de bombas de efluxo MacAB-TolC, MexB e AdeIJK, as quais provavelmente estão sob controle e regulação do sistema BaeSR.

A colistina é o antimicrobiano mais eficiente no tratamento de *A. baumannii* MDR *in vivo*, tem sido reintroduzido para tratamento de *A. baumannii* resistente a carbapenêmico (CAI et al., 2012; VELKOV et al., 2013; GIRARDELLO et al., 2017). Apesar da atividade sinérgica de carbapenêmicos e polimixinas ter sido demonstrada em diferentes estudos *in vitro* (CAI et al., 2012; NI et al., 2015; VOURLI et al., 2015; FAN et al., 2016), a associação do meropenem e colistina neste estudo não foi relacionada à diminuição de expressão dos genes de virulência analisados em isolados resistentes ou sensíveis a estes antimicrobianos.

Com a realização deste estudo pode-se demonstrar uma tendência ao aumento da expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS* e *baeS* após tratamento *in vitro* com o meropenem, colistina e associação em isolados resistentes e sensíveis a estes antimicrobianos, reforçando a necessidade de vigilância quanto ao tratamento de IRAS causados por *A. baumannii* MDR mesmo em uso associado de antimicrobianos.

7 CONCLUSÕES

- Todos os isolados bacterianos do estudo foram identificados como *A. baumannii*, distribuídos em sete padrões genéticos distintos. Ainda, constatou-se que três isolados foram geneticamente relacionados apresentando similaridade de 100%. Estes isolados pertenciam a hospitais diferentes, sugerindo a existência de disseminação inter-hospitalar.
- A grande maioria dos isolados de *A. baumannii* apresentaram os genes de resistência *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-143-like} e o elemento de inserção *ISAba1*. Além desses, o *bla*_{OXA-23-like} foi encontrado em apenas cinco isolados. Também pode-se observar na grande maioria dos isolados a presença dos genes de virulência *basC*, *csuE*, *ompA* e *pilA*. Dessa forma, pode-se constatar uma grande disseminação de genes de resistência e virulência nos isolados de *A. baumannii* oriundos de dois públicos do Recife/PE.
- O tratamento *in vitro* com meropenem, colistina e associação destes antimicrobianos foi relacionado à modificação da expressão dos genes de virulência *csuE*, *bfmS* e *baeS*, com tendência ao aumento da expressão dos mesmos, reforçando a necessidade de vigilância quanto ao tratamento de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde causadas por *A. baumannii* multidroga-resistente, mesmo em uso associado de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ADIBHESAMI, H. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Recovered from Burn Patients. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, CA, v.19, p. 339-348, 2016.
- AGODI, A. et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v.86, p. 260-266, 2014.
- AHMED, S. S. et al. Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, DE, v.35, p. 1463-1468, 2016.
- ALIRAMEZANI, A. et al. Clonal relatedness and biofilm formation of OXA-23-producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. **Microbial Pathogenesis**, London, US, v.99, p. 204-208, 2016.
- ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, [S.l], v. 71, p. 292-301, 2014.
- ATROUNI, A. et al. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, CA, v.52, p. 29-36, 2016.
- AZIZI, O. et al. Molecular Analysis and Expression of *bap* Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**, [S.l], vol.5, p. 62-72, 2016.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. Study of the Moraxella Group I. Genus Moraxella and the Neisseria catarrhalis Group. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v.95, p. 58-73, 1968.
- BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. American Society for Microbiology *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v.9, p. 148-165, 1996.
- BERTONCHELI, C. M.; HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, BR, v.44, p. 577-599, 2008.
- BISWAS, S. et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [S.l], v. 10, p. 917-934, 2012.
- BISWAS, I. Genetic tools for manipulating *Acinetobacter baumannii* genome: an overview. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, GB, v. 64, p. 657-669, 2015.

BIGLARI, S. et al. Molecular characterization of carbapenemase and cephalosporinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary medical centre in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, GB, v.64, p. 53-58, 2015.

BLANCO-LOBO, P. et al. Clinical validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Acinetobacter baumannii* colonization. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, p. 1-4, 2016.

BOUCHER, H. W. et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: Na Update From the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases Advance Access**, [S.l], p. 1-10, 2013.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRAUN, G.; VIDOTTO, M. C. Evaluation of Adherence, Hemagglutination, and Presence of Genes Codifying for Virulence Factors of *Acinetobacter baumannii* Causing Urinary Tract Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v. 99, n. 8, p. 839-844, 2004.

BREIJ, A. et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Research in Microbiology**, Paris, FR, v. 160, p. 213-218, 2009.

BRISOU, J.; PREVOT, A.R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Ann Inst Pasteur (Paris)**, Paris, FR, v.86, p.722-728, 1954.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.39, p.1211-1223, 1995.

BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and Impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v.32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.54, p.969- 976, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, US, v.65, p.455-478, 2011.

BUSH, K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, FR, v.31, p. 43-56, 2012

CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v.67, p. 1607-1615, 2012.

CAYÔ, R. et al. Analysis of Genes Encoding Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 55, p. 5907-5913, 2011.

CARDOSO, J. P. et al. Diversity of mechanisms conferring resistance to β -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, US, v.85, p. 90-97, 2016.

CHANG, K. et al. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, CN, v.46, p. 195-201, 2013.

CHEAH, S. et al. Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. **Scientific Reports**, [S.I.], v.6, p. 1-11, 2016.

CHEN, W. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, US, v.11, p. 2495—2500, 2015.

CISNEROS, J. M.; RODRÍGUES-BAÑO, J. Nosocomial Bacteremia Due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Clinical Features and Treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.

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

COUET, W. et al. Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v.18; p.30–39; 2011.

DHABAAN, G. N. et al. Imipenem Treatment Induces Expression of Important Genes and Phenotypes in a Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.60, p.1370-1376, 2016.

DOI, Y. et al. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, US, v.36, p. 85-98 2015.

DONG, F. et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, Beijing, CN, v. 121, n. 17, p. 1611-1616, 2008.

DORSEY, C. W. et al. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. **Microbiology**, Reading, GB, v.150, p. 3657-3667, 2004.

EIJKELKAMP, B. A. et al. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. **BioMed Central Genomics**, London, GB, v. 12, p. 2-14, 2011a.

EIJKELKAMP, B. A. et al. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 323, p. 44-51, 2011b.

ELABD, F. M. et al. Molecular characterization of oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolates in a Saudi hospital. **Journal of Infection and Public Health**, [S.I.], v.8, p.242-247, 2015.

ESPINAL, P.; MARTI, S.; VILA, J. Effect of formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v.80 p.56-60, 2012.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 27, p. 241-263, 2014.

EVANS, B. A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. The Rise of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, NL, v.19, p. 223-238, 2013.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v.40, p. 1333-1341, 2005.

FALAGAS, M.E.; RAFAIDILIS, P.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. **Critical Care**, v.11, p.1-3, 2007.

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**, San Francisco, US, v. 17, p. 1-12, 2016.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. **Healthcare Epidemiology**, [S.I.], v. 42, p. 692-699, 2006.

GALES, A. C. et al. Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v.32, p. 104-113, 2001.

GIRARDELLO, R. et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, US, v. 87, p. 37-44, 2017.

GONÇALVES, I. R. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilmformation. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, BR, p.1-7, 2016.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10. ed., Mac Graw Hill, 2006.

GOOTZ, T. D. The Global Problem of Antibiotic Resistance. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, US, v. 30, n. 1, p. 79-93, 2010.

GUNDI, V. A. K. B. et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the Identification of Clinically Important and Emerging *Acinetobacter* Species. **Microbiology**, Reading, GB, v. 155, p. 2333-2341, 2009.

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 Journal of Critical Care Medicine**, Mumbai, IN, v.17, p.214-218, 2003.

HARDING, C. M. et al. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not Surface-Associated Motility. **mBIO**, [S.I.], v.4, p.1-10, 2013.

HASAN, T.; CHOI, C. H.; OH, M. H. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. **Genomics & Informatics**, [S.I.], v.13, p. 2-6, 2015.

HE, X. et al. Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.59, p. 4817-4825, 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v.70, p. 1303-1313, 2015.

HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, [S.I.], v.3, p. 243–250; 2012.

HAEGGMAN, S. et al. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 48, p. 2400-2408, 2004.

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. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v.35, n.3, p.305-314, 2010

JACOBY, G. A. β -lactamase Nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 50. p. 1123-1129. 2006.

JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 36, n.7, p. 1938-1941, 1998.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v.11, p. 868–873, 2005.

KARAGEORGOPOULOS, D. E. et al. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v.62, p. 45-55, 2008.

KARAIKOS, I. Colistin Population Pharmacokinetics after Application of a Loading Dose of 9 MU Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.59, p.7240-7248, 2015.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Intrathecal Colistin for Drug-resistant *Acinetobacter baumannii* Central Nervous System Infection: A Case Series and Systematic Review. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S.l.], v.16, n. 7, p. 888-894, 2010.

KHOSRAVI, A. D.; HOVEIZAVI, H.; MEHDINEJAD, M. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Genes for Ctx-M-1, Tem-1 and Shv-1 Extended-Spectrum β Lactamases (ESBL) Enzymes in Clinical Specimens. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [S.l.], v.6, p.1-5, 2013.

KOBS, V. C. et al. The role of the genetic elements *bla_{oxa}* and *ISAba1* in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, BR, v.49, p.433-440, 2016.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido** 6. Ed. Rio de Janeiro: GEN/Guanabara Koogan Editora, 2012.

KROGER, C. et al. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, [S.l.], v.8, p. 1-19, 2017.

LAMAS, A. et al. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella* enteric decrease under anaerobic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v.5, p. 63-67, 2016.

LANNAN, F. M. et al. Evaluation of Virulence Gene Expression Patterns in *Acinetobacter baumannii* Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Array. **Military Medicine**, Bethesda, US, v. 181, p.1108-1113, 2016.

LATIFPOUR, M.; GHOLIPOUR, A.; DAMAVANDI, M. S. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Nosocomial and Community-Acquired Urinary Tract Infections. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [S.l.], v.9, p.1-8, 2016.

LEBLANC, S. K. D.; OATES, C. W.; RAVIO, T. L. Characterization of the Induction and Cellular Role of the BaeSR Two-Component Envelope Stress Response of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v. 193, p. 3367-3375, 2011.

LEE, Y. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a *bla*OXA-51-Like Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.56, p. 1124–1127, 2012.

LENHARD, J. R. et al. Comparative pharmacodynamics of four different carbapenems in combination with polymyxin B against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v. 48, p. 719–724, 2016.

LENHARD, J.R. et al. High-intensity meropenem combinations with polymyxin B: new strategies to overcome carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v. 72, p. 153-165, 2017.

LIN, M. et al. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, CN, p. 1-8, 2015.

LIN, M; LIN, Y; LAN, C. The Role of the Two-Component System BaeSR in Disposing Chemicals through Regulating Transporter Systems in *Acinetobacter baumannii*. **Plos One**, San Francisco, US, p. 1-15, 2015.

LIOU, M. et al. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, CN, v. 46, p. 275-281, 2014.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN. Disponível em:<www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>. Acesso em: 08 de fev. 2017, 14:54:30.

LIVERMORE, D. M. et al. CTX-M: Changing the Face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v.59, p.165-174, 2007.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiologica**, Pavia, IT, v.37, p.119-127, 2014.

LÓPEZ-ROJAS, R. L.; SMANI, Y.; PACHÓN, J. Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [S.l.], v.11, p.231-233, 2013.

LUO, L. et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. **BioMed Central Microbiology**, London, US, v.15, p. 1-7, 2015.

MA, Z. et al. Investigation on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Madison, US, v.8, p. 4429-4432, 2015.

MAGALHÃES, V. D. et al. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, BR, v. 64, p. 155-161, 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. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v.18, p.268-281, 2012.

MAHAMAT, A. et al. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008–2014. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v.48, p. 51-55, 2016.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v.46, p.1254-1263, 2008.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, NL, v.37, p. 130-155, 2013.

MCPHERSON, D. L.; POPHAM, D.L. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v. 185, p.1423-1431, 2002.

MENDES, C. A.; BURDMANN, E. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, BR, v.55, p.752-759, 2009.

MIHARA, K. et al. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. **Microbiology**, Reading, GB, v.150, p. 2587-2597, 2004.

MOFFATT, J. H. et al. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v.54, p. 4971-4977, 2010.

MOLAND, E. S., Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.] v. 51, n. 3, p. 711-714, 2003.

MONTERO, J. G. et al. *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, ES, v.34, p.551-558, 2016.

MUGNIER, P. D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional Analysis of Insertion Sequence ISAbal, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **Journal Of Bacteriology**, Washington, US, v.191, p.2414-2418, 2009.

MUNDAY, C. J. et al. Predominance and genetic diversity of community - and hospital - acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v. 54, p. 628-633, 2004.

NATION, R. L.; LI, J. Colistin in the 21st Century. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, GB, v. 22, p. 535-543, 2009.

NATION, R. L.; VELKOV, T.; LI, J. Colistin and Polymyxin B: Peas in a Pod, or Chalk and Cheese?. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US v.59, p.88-94, 2014.

NEONAKIS, I. K.; SPANDIDOS, D. A.; PETINAKI, E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v.37, p. 102-109, 2011.

NI, W. et al. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v. 45, p.8-18, 2015.

NIKOO, S. J.; ARDEBILI, A.; MARDANEHS, J. Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran: An Update. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, US, p.1-13, 2017.

NIGRO, S. J.; HALL, R. M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v.71, p. 1135-1147, 2016.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance — role of carbapenemases. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, Warszawa, PL, v. 54, p. 61-74, 2016.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 5, p.1-18, 2014.

OPAZO, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, IT, v.6, p.311-316, 2012.

PAUL, M. et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v. 69, p. 2305–2309, 2014.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 21, p. 538–582, 2008.

PENWELL, W. F.; ARIVETT, B. A.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* entA Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence. **Plos One**, São Francisco, US, v. 7, n.5, e36493, 2012.

PIEPENBRINK, K. H. et al. Structural Diversity in the Type IV Pili of Multidrug-resistant *Acinetobacter* **The Journal Biological Chemistry**, [S.I.], p. 1-24, 2016.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S.I.], v.12, p. 826-836, 2006.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v.45, p.568-585, 2015.

QI, L. et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, [S.I.], v. 7, p.1-10, 2016.

REITER, K. C.; SANT'ANNA, F. H.; D'AZEVEDO, P. A. Upregulation of *icaA*, *atlE* and *aap* genes by linezolid but not vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US v. 43, p. 248-253, 2014.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, US, v.22, p.301-311, 2016.

ROJAS, R. L. et al. Pan-resistant *Acinetobacter baumannii* have prompted the search for therapeutic alternatives. We evaluate the efficacy of four cecropin A-melittin hybrid peptides (CA-M) in vivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, DE, v. 30, p. 1391–1398, 2011.

RYU, S. Y.; BAEK, W.; KIM, H. A. Association of biofilm production with colonization among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **The Korean Journal of Internal Medicine**, [S.I.], p.1-7, 2016.

SAFARI, M. et al. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S.l], v.22, p. 424-429, 2015.

SAHL, J. W. et al. Genomic Comparison of Multi-drug Resistant Invasive and Colonizing *Acinetobacter baumannii* Isolated from Diverse Human Body Sites Reveals Genomic Plasticity. **BMC Genomics**, London, GB v.12,p. 1-12, 2011.

SALADIN, M. et al. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v.209, p. 161-168, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v.47S, p. 31-37, 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. **National Academic of Sciences**, [S.l], v.74, p.5463-5467, 1977.

SEIFERT, H. et al. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v.43, p. 4328–4335, 2005.

SELASI, G. N. Differences in Biofilm Mass, Expression of Biofilm-Associated Genes, and Resistance to Desiccation between Epidemic and Sporadic Clones of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 191. **Plos One**, San Francisco, US, v.13, p. 1-13, 2016.

SHENG, W-H. et al. Comparative in Vitro Antimicrobial Susceptibilities and Synergistic Activities of Antimicrobial Combinations Against Carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* Versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S.l], v. 70, p. 380-386, 2011.

STEVENS, D. L.; MA, Y.; SALMI, D .B. Impacto of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicilin-sensitive and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, US, v.195, p. 202-211, 2007.

SUN, J. R. et al. A truncated AdeS kinase protein generated by ISAbal insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, San Francisco, US, v. 7, p. 1-14, 2012.

TAKAGI, E. H. et al. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Outbreak at

University Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v. 40, p.339-341, 2009.

TALBOT, G. H. et al. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 42, p. 657-668, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Jornal of Clinical Microbiology**, [S.l], v.33, p. 2233-2239, 1995.

THUMMEEPK, R. et al. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **International Microbiology**, Barcelona, ES, v.19, p. 121-129, 2016.

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**, Reading, GB, v.149, p.3473–3484, 2003.

TOWNER, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, London, GB, v. 73, p. 355-363, 2009.

TRABULSI, L. R. et al. (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.

TURTON, J. F. et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v.258, p. 72-77, 2006.

TURTON, [J. F.](#) et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S.l], v.13, p. 807-815, 2007.

ALI, L. et al., Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait, **Frontiers in Microbiology**, [S.l], v.6, p. 1-8, 2015.

VELKOV, T. et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. **Future Microbiology**, London, GB, v.8, p.711-724, 2013.

VIJAYKUMAR, S.; BALAJI, V.; BISWAS, I. Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* Strain B8300, Which Displays High Twitching Motility. **Genome Announcements**, [S.l], v.3, p.1-2, 2015.

VILA, J.; PACHÓN, J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [S.l], v.13, p. 2319-2336, 2012.

WEBER, B. S.; HARDING, C. M.; FELDMAN, M. F. Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v.198, p. 880-887, 2016.

<http://www.lahey.org/studies/>

WRIGHT, M. S. et al. New Insights into Dissemination and Variation of the Health Care-Associated Pathogen *Acinetobacter baumannii* from Genomic Analysis. **mBio**, [S.l.], v.5, p.1-13, 2014.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, US, v.27, p. 351-353, 2006.

YOON, J. et al. In Vitro Double and Triple Synergistic Activities of Polymyxin B, Imipenem, and Rifampin against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 48, n. 3, p. 753–757, 2004.

YUHAN, Y. et al. Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 49, p. 165-171, 2016.

ZHAO, S. et al. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, GB, v.14, p.1-8, 2015.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: the Molecular Epidemic Features of an Emerging Problem in Health Care Facilities. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, IT, v. 3, n. 5, p. 335-341, 2009.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB, v. 60, p. 1206-1215, 2007.

ZIMBLER, D. L. et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Biometals**, Oxford, GB, v.22, p. 23-32, 2009

ZUSMAN, O. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Synergy of Polymyxins and Carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 57, p. 5104–5111, 2013.

APÊNDICE A – Artigo 1 submetido a Microbial Drug Resistance

Clonal dissemination of resistance and virulence genes in isolates of *Acinetobacter baumannii* from hospitals in Recife, Pernambuco, Brazil

Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti^{1,2}, Dyana Leal Veras³, Ana Paula Sampaio Feitosa^{1,3}, Eduarda Vanessa Cavalcante Manguiera⁴, Wagner Luís Mendes de Oliveira⁵, Fernanda Cristina Gomes de Lima², Ana Carolina Ramos⁷, Ana Cristina Gales⁷, Luiz Carlos Alves^{1,3,6}, Fábio André Brayner^{1,2,3}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, City University, Recife-PE, Brazil.

²Program of Graduate in Tropical Medicine – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, City University, Recife-PE, Brazil.

³Aggeu Magalhães Research Center - FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego, City University, Recife-PE, Brazil.

⁴Central Laboratory of Public Health - LACEN PE, Street João Fernandes Viêira - Boa Vista, Recife-PE, Brazil.

⁵Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches - UFPE, City University, Recife-PE, Brazil.

⁶Universidade de Pernambuco - UPE, Av. Governador Agamenon Magalhães, Santo Amaro, Recife-PE, Brazil.

⁷Laboratory Alert - Division of Infectious Diseases - Federal University of São Paulo – UNIFESP, São Paulo-SP, Brazil.

Corresponding author: Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti;

Address: Av. Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Phone: +55 81 2101-2643 / +55 81 2101-2687.

Abstract

The aim of this study was to investigate clonal dissemination of resistance and virulence genes in isolates of *A. baumannii* from two public hospitals in Recife, Pernambuco, Brazil. For this, 37 multidrug-resistant (MDR) isolates of the *A. baumannii* complex were obtained in these hospitals, from healthcare-associated

infection (HAI) and through colonization. Molecular typing was done through PFGE. The resistance genes (*bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M}), the insertion element *IS**Aba1* and the virulence genes (*basC*, *ompA*, *pilA* and *csuE*) were detected using the PCR and were confirmed through sequencing. Seven PFGE patterns were identified among the *A. baumannii* isolates analyzed, and three isolates found in both hospitals presented 100% similarity. The majority of the isolates presented all of the virulence genes investigated, with at least two resistance genes relating to β -lactamase production, along with the insertion element *IS**Aba1*. The gene *bla*_{OXA-143-like} was particularly present, in more than 70% of the isolates from both of the hospitals. The results from this study showed that resistance and virulence genes were widely disseminated in isolates of *A. baumannii* from these hospitals, with clonal dispersion at both hospitals and in their different sectors.

APÊNDICE B – Artigo 2 submetido a Journal of Medical Microbiology article

Expression of virulence genes in multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* subjected to colistin and meropenem

Carmelita L. B. Cavalcanti^{1,2,3}, Dyana L. Veras³, Ana Paula S. Feitosa^{1,3}, Eduarda V. C. Manguiera⁴, Fernanda C. G. Lima^{2,3}, Catarina F. Freitas^{2,3}, Luiz C. Alves^{1,3,5}, Fábio A. Brayner^{1,2,3}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - UFPE, Moraes Rego Avenue, University City, Recife – PE, Brazil.

²Program of Graduate in Tropical Medicine - UFPE, Moraes Rego Avenue, University City, Recife – PE, Brazil.

³Aggeu Magalhães Research Center - FIOCRUZ, Moraes Rego Avenue, University City, Recife – PE, Brazil.

⁴Central Laboratory of Public Health - LACEN PE, João Fernandes Vieira Street, Recife – PE, Brazil.

⁵University of Pernambuco – UPE, Arnóbio Marques, Santo Amaro, Recife – PE, Brazil.

Correspondence address

Carmelita L. B. Cavalcanti
carmelitadelima@gmail.com
+ 55 81 2101- 2643/2101-2687

Abstract

The challenge in treating infections caused by isolates of *Acinetobacter baumannii* is partly due to their capacity to express different virulence factors and to acquire mechanisms for resistance to various classes of antimicrobial agents. This has led to a search for new treatments, including combined use of these agents. Because combined use of colistin and meropenem has been indicated as an option for treating infections caused by multidrug-resistant isolates of *A. baumannii*, the objective of this study was to determine the *in vitro* influence of colistin and

meropenem separately and in combination, on the expression of the virulence genes *baeS*, *bfmS* and *csuE* in *A. baumannii* isolates. Three multidrug-resistant clinical isolates and the ATCC 19606 isolate of *A. baumannii* were used. Only meropenem was capable of diminishing the expression of one of the virulence genes (*csuE*). However, when meropenem was used in association with colistin, there was no modulation of the expression of this virulence gene. Our results showed a tendency towards increased expression of the virulence genes *csuE*, *bfmS* and *baeS* after *in vitro* treatment of both resistant and sensitive *A. baumannii* isolates, with colistin and meropenem separately and in combination. These results emphasize the need for vigilance regarding treatment of healthcare-associated infection caused by multidrug-resistant *A. baumannii*, even when these two antimicrobial agents are used in combination.

ANEXO A – Comprovante de submissão à revista Microbial Drug Resistance

09/02/2017

Gmail - Microbial Drug Resistance - MDR-2017-0051 has been unsubmitted



Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti <carmelitadelima@gmail.com>

Microbial Drug Resistance - MDR-2017-0051 has been unsubmitted

1 mensagem

Microbial Drug Resistance

8 de fevereiro de 2017

<onbehalfof+hcurry@mail.rockefeller.edu@manuscriptcentral.com>

13:10

Responder a: hcurry@mail.rockefeller.edu

Para: carmelitadelima@gmail.com

08-Feb-2017

Dear Dr. Cavalcanti:

Your manuscript, MDR-2017-0051, entitled "Clonal dissemination of resistance and virulence genes in isolates of *Acinetobacter baumannii* from hospitals in Recife, Pernambuco, Brazil" has been unsubmitted to Microbial Drug Resistance. It may either have been unsubmitted at your request or because you did not complete all necessary parts of the submission.

Please make sure that the title page is with the authors information is immediately followed by the Abstract which should be on a separate page; this should then be followed by the Introduction, etc. Please format your references, they should not be capitalized as they currently are.

Please visit the instructions to authors to complete your submission and re-submit the manuscript for consideration of publication. You may contact the Editorial Office if you have further questions.

Sincerely,
Microbial Drug Resistance Editorial Office

APÊNDICE B – Artigo 2 submetido a Journal of Medical Microbiology article

09/02/2017

Gmail - Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-17-00096 - [EMID:5fb8e628114f75a8]



Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti <carmelitadelima@gmail.com>

Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-17-00096 - [EMID:5fb8e628114f75a8]

1 mensagem

JMM <em@editorialmanager.com>

7 de fevereiro de 2017 20:01

Responder a: JMM <jmm@microbiologysociety.org>

Para: Carmelita Lima Cavalcanti <carmelitadelima@gmail.com>

CC: dyana_leal@yahoo.com.br, sampaiofeitosa@hotmail.com, eduardamangueira@gmail.com, fernandalima.fel@gmail.com, catarinaffreitas@gmail.com, lcalves@cpqam.fiocruz.br, brayner.santos@gmail.com

Ms. No. JMM-D-17-00096

Expression of virulence genes in multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* subjected to colistin and meropenem

Carmelita Lima Cavalcanti; Dyana Veras; Ana Paula Feitosa; Eduarda Mangueira; Fernanda Lima; Catarina Freitas; Luiz Alves; Fábio Brayner

Dear Dra Cavalcanti,

Your submission entitled "Expression of virulence genes in multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* subjected to colistin and meropenem" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jmm.edmgr.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-17-00096. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.