



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

ADRIANA MARIA COSTA MARQUES DA SILVA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS GENES DE VIRULÊNCIA DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO
DE *Acinetobacter* spp. MULTIDROGA-RESISTENTES**

Recife

2020

ADRIANA MARIA COSTA MARQUES DA SILVA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS GENES DE VIRULÊNCIA DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO
DE *Acinetobacter* spp. MULTIDROGA-RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Coorientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S586a Silva, Adriana Maria Costa Marques da.
Análise fenotípica e molecular dos genes de virulência da formação de biofilme em isolados de infecção e colonização de *Acinetobacter spp.* Multidroga-resistentes / Adriana Maria Costa Marques da Silva. – 2020.
84 f.: il. tab.; 30 cm.
- Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Biofilmes. 2. Virulência. 3. Colonização. 4. *Acinetobacter spp.* 5. ERIC-PCR. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-119)

ADRIANA MARIA COSTA MARQUES DA SILVA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS GENES DE VIRULÊNCIA DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO
DE *Acinetobacter* spp. MULTIDROGA-RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovada em: 05/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Sotero Siqueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça da vida, pelos momentos de luta e desafios superados, permitindo-me realizar este sonho. Obrigada por colocar tantas pessoas especiais em meu caminho, que me fizeram crescer e alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais, Wilson e Valmeres, pelo apoio e dedicação desde os meus primeiros passos. Obrigada pelo incentivo, amor e por sempre acreditarem em mim. Espero ter dado orgulho a vocês e ter correspondido todo o esforço devotado a mim até o momento.

Aos meus familiares por acreditarem na minha capacidade de aprender, pelo carinho e afeto.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel, pelos ensinamentos e orientações, por acreditar no meu potencial e minha competência, e especialmente pelo carinho e amizade.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti, pela aprendizagem, amizade e participação na minha construção profissional.

Aos parceiros do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, em especial Sérgio Dias e Jailton Lobo, pelo acolhimento, apoio, conhecimentos adquiridos e pelas experiências vividas durante esses dois anos de mestrado.

À 34ª turma de mestrado do Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical da UFPE pela amizade, cumplicidade e compartilhamento de conhecimento e sabedoria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) [APQ-0814-4.03/17] pelo suporte financeiro.

Aos meus amigos, obrigada pelo carinho, companheirismo, ternura e por sempre estarem ao meu lado.

RESUMO

As cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp. são hoje consideradas uma ameaça à saúde pública global, sendo responsáveis por diferentes tipos de infecções relacionadas à assistência à saúde, além de apresentarem elevado potencial para produção de biofilme. O biofilme é um fator de virulência, que facilita a adesão bacteriana, como também aumentam a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, contribuindo para a colonização e infecção dos pacientes hospitalizados. Diante do exposto, objetivou-se analisar a produção fenotípica e molecular de biofilme em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de amostras de infecção e de colonização de pacientes internados em um hospital público de Recife-PE em 2018-2019. Os microrganismos foram avaliados pelo método de coloração com cristal violeta para análise fenotípica da formação de biofilme, PCR para pesquisa de genes de virulência (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*) e ERIC-PCR para tipagem molecular. Entre os 38 isolados de *Acinetobacter* spp., 20 foram obtidos de amostras de infecção e 18, de colonização. Dentre os isolados analisados, 86,85% (33/38) eram multidroga-resistentes, com alta prevalência de resistência à polimixina B, que incluiu 15% (3/20) dos isolados de infecção e 11,11% (2/18) dos isolados de colonização. Todos os 38 isolados produziram biofilme. Todos os isolados continham, pelo menos, um dos genes de virulência investigados no seu perfil molecular e o gene *bap* foi o mais frequente, presente em 100% dos isolados. A ocorrência dos genes *ompA*, *csuE*, *bfmS* e *epsA* entre os isolados de infecção foi de 95% (19/20), 85% (17/20), 70% (14/20) e 65% (13/20), respectivamente. Entre os isolados de colonização, a frequência dos genes de virulência foi de 94,44% (17/18) para *ompA* e *csuE*, seguido de 61,11% (11/18) para *bfmS* e *epsA*. Não foi detectado clones pela técnica de ERIC-PCR. Este estudo não visualizou correlação entre a formação de biofilme e o perfil de resistência das bactérias nem com o perfil molecular dos genes de virulência investigados. Desse modo, os resultados encontrados demonstraram que a detecção fenotípica da formação de biofilme e a pesquisa dos genes de virulência são relevantes, haja vista a habilidade desse patógeno em formar biofilme, especialmente pela similaridade dos padrões percentuais encontrados entre os isolados de infecção e de colonização, indicando, assim, a necessidade do monitoramento contínuo do ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Biofilmes. Virulência. Colonização. *Acinetobacter* spp. ERIC-PCR.

ABSTRACT

The multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. today they are considered a threat to global public health, being responsible for different types of infections related to health care, in addition to presenting high potential for biofilm production. Biofilm is a virulence factor, which facilitates bacterial adhesion, as well as increasing the resistance of microorganisms to antimicrobials, contributing to the colonization and infection of hospitalized patients. Given the above, the objective was to analyze the phenotypic and molecular production of biofilm in isolates of *Acinetobacter* spp. from samples of infection and colonization of patients admitted to a public hospital in Recife-PE in 2018-2019. Microorganisms were evaluated using the violet crystal staining method for phenotypic analysis of biofilm formation, PCR for virulence genes (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* and *bfmS*) and ERIC-PCR for molecular typing. Among the 38 isolates of *Acinetobacter* spp., 20 were obtained from infection samples and 18 from colonization. Among the isolates analyzed, 86.85% (33/38) were multidrug-resistant, with a high prevalence of resistance to polymyxin B, which included 15% (3/20) of infection isolates and 11.11% (2/18) of colonization isolates. All 38 isolates produced biofilm. All isolates contained at least one of the virulence genes investigated in their molecular profile and the *bap* gene was the most frequent, present in 100% of the isolates. The occurrence of the *ompA*, *csuE*, *bfmS* and *epsA* genes among infection isolates was 95% (19/20), 85% (17/20), 70% (14/20) and 65% (13/20), respectively. Among colonization isolates, the frequency of virulence genes was 94.44% (17/18) for *ompA* and *csuE*, followed by 61.11% (11/18) for *bfmS* and *epsA*. No clones were detected using the ERIC-PCR technique. This study showed no correlation between the formation of biofilm and the resistance profile of the bacteria or the molecular profile of the investigated virulence genes. Thus, the results found showed that the phenotypic detection of biofilm formation and the search for virulence genes are relevant, given the ability of this pathogen to form biofilm, especially due to the similarity of the percentage patterns found between infection and colonization isolates, thus indicating the need for continuous monitoring of the hospital environment.

Keywords: Biofilms. Virulence. Colonization. *Acinetobacter* spp. ERIC-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição mundial de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenêmicos.....	21
Figura 2 –	Mecanismos da colonização, infecção e disseminação de <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
Figura 3 –	Fatores de virulência de <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
Figura 4 –	Representação esquemática do ciclo de formação de biofilme.....	30
Figura 5 –	Rede regulatória da formação de biofilme de <i>Acinetobacter baumannii</i>	31
Figura 6 –	Transmissão de mecanismos de resistência antimicrobiana e virulência.....	34
Figura 7 –	Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.....	41
Figura 8 –	Produtos de PCR do gene <i>bla_{OXA-51-like}</i> de 353 pb para identificação molecular da espécie <i>Acinetobacter baumannii</i>	77
Figura 9 –	Produtos de PCR da técnica ERI-PCR a partir do DNA total de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp.....	77
Figura 10 –	Produtos de PCR do gene <i>ompA</i> de 531 pb a partir do DNA total de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp., temperatura de pareamento 55°C.....	78

Artigo

Figura 1 –	Perfis de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. em Recife-PE.....	51
Figura 2 –	Comparação do perfil fenotípico da formação de biofilme dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. distribuídos entre isolados de infecção e colonização em Recife-PE.....	52
Figura 3 –	Correlação da formação de biofilme e o perfil de resistência dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. em Recife-PE.....	53
Figura 4 –	Dendograma relativo aos padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. em Recife-PE.....	54

Figura 5 – Dendograma relativo aos padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp. em Recife-PE.....	54
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Quantitativo de artigos em espécies de <i>Acinetobacter</i> isoladas clinicamente.....	17
Tabela 2 –	Métodos de controle e prevenção de infecções por <i>Acinetobacter</i> multirresistente.....	24
Tabela 3 –	Variáveis relacionadas à caracterização genética dos genes de virulência.....	38
Tabela 4 –	Lista de <i>primers</i> para a pesquisa dos genes de virulência em <i>Acinetobacter</i> spp.....	42
Tabela 5 –	Identificação de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. através das características clínicas, fenotípicas e molecular.....	72

Artigo

Tabela 1 –	Lista de <i>primers</i> e as condições de amplificação para a pesquisa dos genes de virulência em <i>Acinetobacter</i> spp.....	49
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
AHI	Lactona N-acil-homoserina
AHI-12	Lactona N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bap	Proteína associada ao biofilme
BHI	Infusão de cérebro-coração
CAMHB	Caldo Müeller-Hinton de cátions ajustado
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CRAb	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
DOc	Densidade ótica do controle negativo
DOi	Densidade ótica do isolado
DO	Densidade ótica
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
EPS	Exopolissacarídeo
ERIC-PCR	Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e espécies de <i>Enterobacter</i>
ICS	Infecções da corrente sanguínea
IC _{95%}	Intervalo de confiança de 95%
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
LB	Luria Bertani
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo
MDR	Multidroga-resistente
MDS	Multidroga-sensível
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
Omp	Proteína da membrana externa
OmpA	Proteína da membrana externa A
OXA	Oxacilinase
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
PCIH	Programa de Controle de Infecções Hospitalares
PNAG	Poly- β -1,6- <i>N</i> -acetilglucosamina
QS	<i>Quorum Sensing</i>
T1SS	Sistema de Secreção Tipo 1
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivamente resistentes aos medicamentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	16
2.2	IMPORTÂNCIA DE <i>Acinetobacter</i> spp. NAS INSTITUIÇÕES DE SAÚDE..	19
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE.....	25
2.3.1	Formação de biofilme.....	29
2.3.1.1	Genes de virulência.....	31
2.4	RELAÇÃO ENTRE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	36
4.2	LOCAL DO ESTUDO.....	36
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	36
4.4	DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	36
4.5	PADRONIZAÇÃO E TÉCNICAS LABORATORIAIS EMPREGADAS.....	38
4.5.1	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	38
4.5.2	Caracterização fenotípica da produção de biofilme.....	40
4.5.3	Extração do DNA total.....	40
4.5.4	Identificação molecular do <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	41
4.5.5	Deteção dos genes de virulência.....	41
4.5.6	Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR).....	43
4.5.7	Análise estatística.....	43
4.5.8	Considerações éticas.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	ARTIGO: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS GENES DE VIRULÊNCIA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE <i>Acinetobacter</i> spp. MULTIDROGA-RESISTENTES.....	44
6	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

APÊNDICE A – TABELA DE RESULTADOS.....	72
APÊNDICE B – FOTOS DOS RESULTADOS.....	77
ANEXO A – PROCESSO DE SUBMISSÃO.....	79

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* é constituído por cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, imóveis, não fermentadores de glicose, catalase positivos e oxidase negativos (LEE et al., 2017). Dentre as 63 espécies com nomes válidos, *Acinetobacter baumannii* é o patógeno mais relevante clinicamente e, juntamente com as espécies *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijksboorniae* compõe o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), sendo um potencial patógeno de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; NEMEC, 2019; VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

As cepas de *Acinetobacter* spp., em especial as de *Acinetobacter baumannii*, são consideradas uma ameaça à saúde pública no cenário global, principalmente devido à sua propensão para adquirir mecanismos de resistência, o que favorece a sua sobrevivência sob pressão seletiva de antimicrobianos, propiciando, assim, a disseminação de cepas multirresistentes (REENA; SUBRAMANIYAN; KANUNGO, 2017; ALMASAUDI, 2018). No Brasil, identificou-se que a taxa de resistência de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos foi de 77,7% nas UTIs adulto, sendo essa a maior taxa observada entre os bacilos Gram-negativos (BRASIL, 2017a). Além disso, *Acinetobacter* spp. tem a habilidade para produzir biofilmes, que é um dos principais fatores de virulência envolvidos na resistência bacteriana a antimicrobianos, bem como facilita a colonização bacteriana, complicações no tratamento das infecções e a persistência de patógenos em ambientes hospitalares e dispositivos médicos (LEE et al., 2017; MORRIS et al., 2019).

O biofilme consiste em uma comunidade microbiana ligada à superfície envolvida por uma matriz extracelular (FLEMMING et al, 2016). Essa capacidade de adesão bacteriana, formação e desenvolvimento de biofilme envolvem redes regulatórias complexas que coordenam a expressão temporal de genes relacionados à adesão, motilidade e síntese de componentes da matriz (RUMBO-FEAL et al., 2013). Entre os genes determinantes de virulência relacionados ao biofilme em *Acinetobacter* spp., pode-se destacar os genes *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* (THUMMEERAK et al., 2016; ZEIGHAMI et al., 2019).

A produção do pili é primordial para a formação do biofilme (AMIN et al., 2019). Essa estrutura é formada através do sistema de secreção pili CsuA/BABCDE, regulado pelo sistema

de dois componentes *bfmRS*, e que são relevantes para a formação e manutenção de biofilme de *Acinetobacter* spp. em superfícies inanimadas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). O gene *csuE* codifica parte do sistema de montagem do *Csu* pili e age como uma adesina de ligação à superfície no início do processo de formação do biofilme (TURTON et al., 2007; PAKHARUKOVA et al, 2018). Além disso, a proteína *OmpA*, dentre outras funções na patogênese bacteriana, age na adesão entre o patógeno e as células epiteliais humanas, e o exopolissacarídeo extracelular (EPS), codificado pelo gene *epsA*, também está envolvido na adesão célula-superfície e célula-célula, além de proteger as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ambos atuam na indução da formação de biofilme (THUMMEEPK et al., 2016).

A proteína *Bap*, codificada pelo gene *bap*, é uma adesina de superfície que está envolvida na adesão intercelular em biofilme maduro e no volume da biomassa. Essa proteína é considerada um componente-chave na formação de biofilme em *A. baumannii* e pode ter participação na persistência do processo infeccioso provocado pela bactéria (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012; RUMBO-FEAL et al., 2013).

Em *A. baumannii*, a prevalência dos casos de colonização são maioria em relação aos casos de infecção (MARTINS; BARTH, 2013). Essa alta capacidade colonizadora combinada com a multirresistência frente aos antimicrobianos nesse microrganismo constituem fatores predisponentes ao desenvolvimento ou agravamento de infecções relacionadas à saúde, como também favorece a sobrevivência do patógeno e sua disseminação na unidade hospitalar (BADAVE, DHANANJAY, 2015; RYU; BAEK; KIM, 2017).

Portanto, o presente estudo objetivou caracterizar fenotipicamente a produção de biofilme por isolados clínicos de *Acinetobacter* spp provenientes de infecção e colonização, além de pesquisar a ocorrência dos genes de virulência (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*) e descrever a relação clonal entre os isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* é constituído por cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, imóveis, não fermentadores de glicose, catalase positivos e oxidase negativos (LIN; LAN, 2014; LEE et al., 2017). De fácil cultivo em meio laboratorial, em placas de ágar sangue, as colônias de *Acinetobacter* spp. exibem formas e tamanhos típicos, sendo incolores (branca ou creme), lisas ou mucoides (quando a cápsula está presente), não hemolíticas, com uma superfície de 1 a 2 mm de diâmetro, após incubação a 37 °C de 18–24 horas. No meio ágar MacConkey, as colônias crescem bem e produzem uma leve coloração rosa (ALMASAUDI, 2018).

Descoberto em 1911, pelo microbiologista holandês Beijerinck, após isolamento do solo e descrição de um patógeno chamado *Micrococcus calcoaceticus*, o gênero *Acinetobacter* (da palavra grega “akineto”, ou seja, não móvel) sofreu variadas modificações taxonômicas até sua atual designação. Essa denominação foi sugerida em 1954 por Brisou e Prevot, como proposta de separar microrganismos imóveis dos que tinham motilidade dentro do gênero *Achromobacter*, e se tornou mais amplamente aceita em 1968, após publicação da pesquisa de Baumann e colaboradores (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; ALMASAUDI, 2018).

Baseados na técnica de hibridização DNA-DNA, em 1986, Bouvet e Grimont elaboraram uma nova classificação que distinguiram dentro do gênero *Acinetobacter* 12 grupos ou genoespécies, que podiam ser diferenciados por 28 testes fenotípicos (KONEMAN et al., 2008; ALMASAUDI, 2018). De acordo com a taxonomia atual, classificado na família *Moraxellaceae*, o gênero *Acinetobacter* inclui 63 espécies com nomes válidos (NEMEC, 2020), das quais 20 são ocasionalmente categorizadas como patogênicas e isoladas de humanos, conforme demonstra Shin e Park (2017) (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantitativo de artigos com espécies de *Acinetobacter* isoladas clinicamente.

Espécies clínicas isoladas	Número de artigos*				Total*
	1948–1999	2000–2005	2006–2011	2012–2017	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	376	579	1919	3532	6406
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1057	169	188	223	1637
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	74	47	65	78	264
<i>Acinetobacter baylyi</i>	-	4	97	87	188
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	67	24	30	52	173
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	47	34	26	50	157
<i>Acinetobacter junii</i>	35	26	37	46	144
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	25	30	22	33	110
<i>Acinetobacter pittii</i>	-	-	6	99	105
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	-	-	7	96	103
<i>Acinetobacter ursingii</i>	-	2	10	12	24
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	-	-	2	18	20
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	-	-	2	17	19
<i>Acinetobacter schindleri</i>	-	1	5	10	16
<i>Acinetobacter parvus</i>	-	1	-	9	10
<i>Acinetobacter seifertii</i>	-	-	-	10	10
<i>Acinetobacter variabilis</i>	-	-	-	5	5
<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	-	-	-	1	1
<i>Acinetobacter vivianii</i>	-	-	-	1	1
<i>Acinetobacter modestus</i>	-	-	-	1	1

* Número de artigos no PubMed.

Fonte: Adaptado de Shin; Park (2017).

Segundo Shin e Park (2017), dentre as espécies do gênero *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* são comumente isoladas de pacientes hospitalizados, embora, entre os anos de 2012 a 2017, várias novas espécies isoladas de amostras clínicas tenham sido descritas como futuros patógenos, como *Acinetobacter seifertii*, *Acinetobacter variabilis*, *Acinetobacter proteolyticus*, *Acinetobacter vivianii* e *Acinetobacter modestus* (Tabela 1). No entanto, o patógeno mais relevante clinicamente é *A. baumannii*, que provoca várias infecções, como pneumonia, sepse, infecções de pele e tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário e meningite secundária, especialmente em pacientes imunocomprometidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (McCONNELL; ACTIS; PACHON, 2013; ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014).

O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) é um grupo constituído pelas espécies *A. baumannii*, *A. pittii* (anteriormente denominada genoespécie 3), *A. nosocomialis* (anteriormente denominada genoespécie 13TU) e *Acinetobacter calcoaceticus* (de predominância ambiental), pois estão intimamente relacionadas e são de difícil distinção

uma da outra por propriedades fenotípicas (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; LI et al., 2016). Recentemente, duas novas espécies, *Acinetobacter seifertii* (anteriormente conhecida como espécie genômica próxima a 13TU) e *Acinetobacter dijkschoorniae* (relacionada a *A. pittii*) também foram incluídas no complexo ACB (NEMEC et al., 2015; COSGAYA et al., 2016).

Antes considerado um patógeno de baixa virulência, *A. baumannii* tem se destacado, nos dias atuais, como agente causador de infecções hospitalares em todo o mundo, representando até 20% das infecções em UTI (KRÖGER et al., 2017; LEE et al., 2017). Essa bactéria apresenta mecanismos que intensificam sua patogenicidade, como sua capacidade em transferir material genético, especialmente genes de resistência antimicrobiana, possibilitando, assim, a aquisição de novos mecanismos de resistência, como também induz a formação de biofilme, o que favorece a colonização de pacientes e equipamentos, e constitui uma fonte de infecção persistente no ambiente hospitalar (REENA; SUBRAMANIYAN; KANUNGO, 2017; ALMASAUDI, 2018). Nas últimas décadas, a intensificação do uso de ventilação mecânica, cateterismo venoso central e urinário e a alta exposição a antimicrobianos na assistência médica são caracterizados como alguns fatores de risco para colonização e infecção que propiciam um aumento na frequência e gravidade das infecções por *Acinetobacter* (WONG et al., 2017).

De ampla distribuição na natureza, a maioria das espécies que integram o gênero *Acinetobacter* não é patogênica e são encontradas em diferentes fontes ambientais, como solo, água, esgoto, vegetais, animais e em seres humanos, e podem fazer parte da microbiota humana, enquanto as cepas patogênicas são comumente isoladas em áreas hospitalares e amostras clínicas, como é o caso da *A. baumannii* (AL ALTROUNI et al., 2016). Essa bactéria sobrevive em superfícies secas, como colchões, travesseiros e maçanetas, bem como dispositivos médicos, pois suporta condições de escassez nutricional, o que facilita a sua persistência e disseminação no ambiente hospitalar (ALMASAUDI, 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

A identificação da espécie de *Acinetobacter* spp. é essencial para avaliar a incidência de cada cepa nos contextos clínicos e sua virulência como patógeno humano (LI et al., 2016). Porém, a diferenciação a nível de espécie dentro do complexo ACB ainda é um desafio (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019). A identificação presuntiva das espécies de *Acinetobacter* pode ser efetuada com base na ausência da atividade citocromo oxidase, ausência de motilidade e resistência à penicilina (KONEMAN et al., 2008). Além

disso, métodos automatizados, como os sistemas de kits comerciais Vitek[®] 2 e Phoenix[®], também são utilizados para identificação dos isolados de *Acinetobacter*. Entretanto, devido ao limitado conteúdo do banco de dados, como os substratos (açúcares e enzimas) usados não foram projetados especificamente para identificar as espécies de *Acinetobacter*, esses sistemas automatizados não discriminam as espécies clinicamente relevantes do complexo ACB (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019). Nesses casos, a diferenciação dessas espécies requer métodos de biologia molecular, que não são empregados regularmente em laboratórios de diagnóstico clínico de rotina (MARTINS; BARTH, 2013).

Os métodos moleculares validados para identificação genotípica das espécies de *Acinetobacter* incluem a técnica de hibridação DNA-DNA, o sequenciamento do gene 16S rRNA e *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), a detecção por reação em cadeia de polimerase (PCR) do gene *bla*_{OXA-51} que é intrínseco da espécie *A. baumannii*, a técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF), entre outros (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019).

2.2 IMPORTÂNCIA DE *Acinetobacter* spp. NAS INSTITUIÇÕES DE SAÚDE

O sistema de saúde é desafiado constantemente por quadros infecciosos relacionados à assistência, que constituem grave problema de saúde pública de âmbito mundial (KOBBS et al., 2016). As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), também conceituadas como infecções hospitalares para fins de classificação epidemiológica, são infecções adquiridas setenta e duas horas após a admissão do paciente, com manifestação sintomática durante a hospitalização ou após a alta, relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (SIQUEIRA et al., 2018). As IRAS são conhecidas por aumentar a morbidade, a mortalidade, o tempo de internação hospitalar e o custo dos cuidados médicos, sendo de maior prevalência em UTIs, devido ao estado sistema imunológico dos pacientes e a constante necessidade de procedimentos invasivos (SIQUEIRA et al., 2018; SULTAN; SELIEM, 2018).

Segundo relato da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2011, até 7% dos pacientes em países desenvolvidos e 10% dos países em desenvolvimento foram acometidos

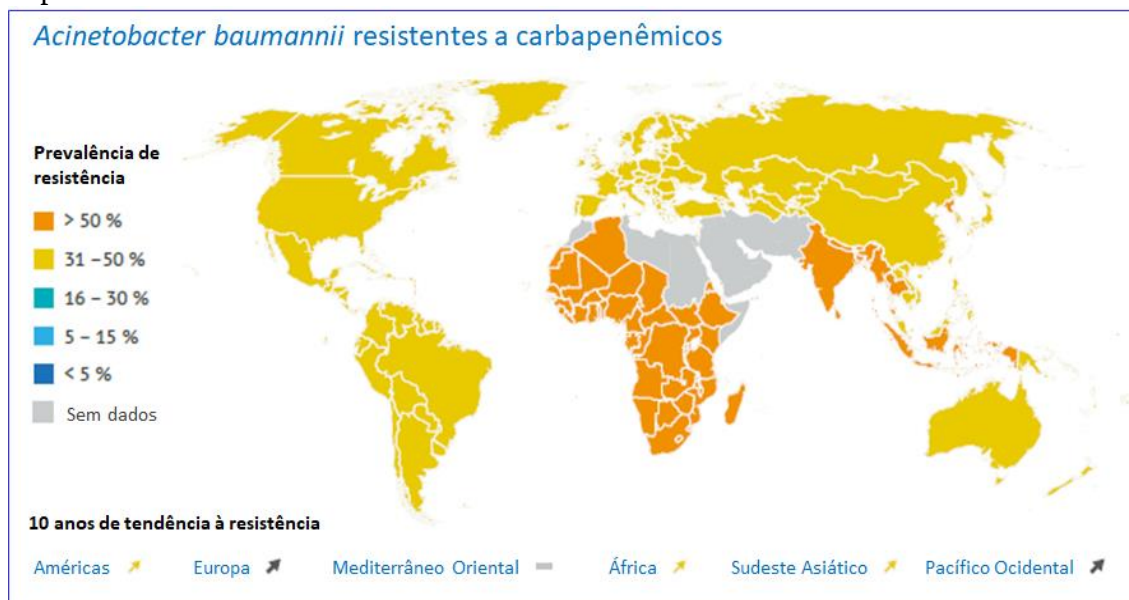
por algum evento adverso provocado por IRAS (WHO, 2016). Na Europa, mais de 4 milhões de pacientes são afetados por aproximadamente 4,5 milhões de episódios de IRAS por ano, levando a 37.000 mortes atribuídas. Nos Estados Unidos, cerca de 1,7 milhão de pacientes são afetados por IRAS anualmente, com uma prevalência de 4,5% que representa 99.000 mortes. Nos países em desenvolvimento, o aumento o tempo de internação hospitalar associado às IRAS varia entre 5 e 29,5 dias. Na América Latina, Ásia e África, entre pacientes adultos, o excesso de mortalidade devido a essas infecções foram 18,5%, 23,6% e 29,3%, para infecções do trato urinário associadas ao implante de cateter, infecções da corrente sanguínea (ICS) e pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV), respectivamente (WHO, 2016). No Brasil, estima-se que cerca de 15% dos pacientes internados desenvolvam IRAS e que essas infecções podem ser responsáveis por até 40% de todos os óbitos de neonatos (PEREIRA et al., 2016).

Esse cenário e as taxas de mortalidade referentes as IRAS são desenhados em virtude da influência de fatores que variam conforme a topografia da infecção, alguma doença de base apresentada pelo paciente, bem como o agente etiológico, associados à escassez e qualificação de recursos humanos e à estrutura física inadequada em serviços de saúde (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; SOARES et al., 2017). Em contrapartida, há evidências que, quando as instituições de assistência à saúde adotam medidas para prevenção de IRAS, há redução de até 70% dessas infecções (BRASIL, 2017).

Apesar do avanço científico e tecnológico relacionado aos cuidados médicos, o avanço global da resistência antimicrobiana consiste numa ameaça para o crescimento das IRAS (SOARES et al., 2017). *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* são considerados, pela comunidade científica internacional, patógenos que podem apresentar um perfil multidroga-resistentes causadores de IRAS (BHAGIRATH et al., 2019). Devido à gravidade das doenças associadas à saúde e a emergência de multirresistência antimicrobiana, *A. baumannii* foi incluído pela *Infectious Diseases Society of America* como membro de um grupo de microrganismos denominado de ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) (LEE et al., 2017; MORRIS et al., 2019). As manifestações clínicas mais frequentes da infecção hospitalar por *A. baumannii* são associadas às ICS relacionadas a cateteres centrais e a PAV, ambas relacionadas a morbidade e mortalidade consideráveis, que podem chegar a 52% (SULTAN; SELIEM, 2018).

O isolamento de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos (CRAb) está cada vez mais frequente no panorama mundial (SULTAN; SELIEM, 2018) (Figura 1). Dados publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) evidenciaram que, no Brasil, dentre amostras clínicas de hemoculturas, cerca de 40% dos isolados de *Klebsiella* spp. eram resistentes aos carbapenêmicos. No caso de *Acinetobacter* spp., a resistência aos carbapenêmicos é encontrada em quase 80% dos pacientes brasileiros com ICS causada por este agente (BRASIL, 2017). Paradoxalmente, à medida que aumenta o surgimento de microrganismos resistentes frente aos antimicrobianos disponíveis, é lenta a descoberta de novos antimicrobianos a serem empregados na terapêutica (SIQUEIRA et al., 2018). Diante disso, a OMS elaborou uma relação de patógenos bacterianos resistentes, a fim de orientar a priorização da pesquisa e do desenvolvimento (P&D) de novos tratamentos antimicrobianos, em que cepas de CRAb apresentam-se como prioridade crítica nessa busca contra o crescimento da resistência antimicrobiana (WHO, 2017).

Figura 1 - Distribuição mundial de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos.



Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Os isolados CRAb são relevantes na clínica, pois são propensos a colonização e a infecção de pacientes, especialmente em UTI. No estudo de Neves e colaboradores (2016), realizado em um hospital universitário em Belo Horizonte, no Brasil, de um total de 56 pacientes, 38 (67,9%) estavam colonizados e 18 (32,1%) estavam infectados com CRAb, sendo

que 49 pacientes (87,5%) apresentavam fatores de risco para colonização de CRAb, principalmente relacionados a dispositivos invasivos. Nessa população estudada, 33 pacientes (59%) morreram durante a internação hospitalar (NEVES et al., 2016).

Além de apresentarem resistência intrínseca a antimicrobianos, muitos isolados clínicos de *A. baumannii* são capazes de aderir e produzir biofilme em superfícies bióticas e abióticas (DUARTE et al., 2016; RAIBLE et al., 2017). Por conseguinte, a importância médica de cepas de *A. baumannii* produtoras de biofilme é destacada pelo alto nível de resistência à desinfecção, o que contribui para a sobrevivência e persistência dessa bactéria no ambiente hospitalar, facilitando, dessa forma, a colonização de pacientes e equipamentos, e subsequentemente, casos de surtos hospitalares devido a disseminação dessas cepas nas instituições de saúde, bem como a reincidência de infecções relacionada a dispositivos médicos (REENA; SUBRAMANIYAN; KANUNGO, 2017).

Em *A. baumannii*, casos de colonização são mais prevalentes que de infecção e a alta capacidade colonizadora desse microrganismo combinada com a sua multirresistência frente aos antimicrobianos constituem fatores de risco para a gravidade das infecções relacionadas à saúde, bem como para a sobrevivência do patógeno e sua disseminação na unidade hospitalar (MARTINS; BARTH, 2013; BADAVE, DHANANJAY, 2015; RYU; BAEK; KIM, 2017). Em estudo prospectivo, realizado em uma unidade de queimados em Paris, constatou-se que a incidência cumulativa de infecção hospitalar por cepas multirresistentes de *A. baumannii* foi de 15% para 44% em 28 dias entre os pacientes com colonização prévia. Nesse mesmo estudo, detectou-se que dos 15 pacientes com infecção clínica, 13 (87%) tiveram cultura de vigilância positiva previamente documentada, reforçando, dessa forma, a relação da colonização prévia como fator de risco no desenvolvimento da infecção hospitalar (MUNIER et al., 2019).

De acordo com o *European Centre for Disease Prevention and Control*, aproximadamente 20% a 30% das IRAS são consideradas evitáveis por meio de programas de controle e higiene intensivos (BRASIL, 2017). No Brasil, a preocupação com as IRAS vem crescendo desde a década de 1990 (ARAÚJO; PEREIRA, 2017). Considerando que as infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários, e sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação da assistência hospitalar, o Ministério da Saúde promulgou a Lei Federal 9.431, de 6/1/1997, que instituiu a obrigatoriedade da existência do Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH) em todos os hospitais do país. Este programa é um conjunto de ações desenvolvidas para avaliação e promoção dos cuidados da

saúde, com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares. Para a adequada execução do PCIH, os hospitais deverão constituir uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) que é um órgão de assessoria à autoridade máxima da instituição e de execução das ações de controle de infecção hospitalar, com o principal objetivo a prevenção e redução nas taxas de infecções e na morbidade e mortalidade (BRASIL, 1997). Seguindo a linha de recomendações mundiais, em 2017, a ANVISA publicou o caderno de Medidas e Prevenção de Infecção Relacionada à Saúde, uma série que visa a segurança do paciente e a qualidade dos serviços de saúde (BRASIL, 2017a).

Dada a alta capacidade de sobrevivência, *A. baumannii* é facilmente disseminado no hospital, sendo as mãos dos profissionais um dos principais vetores na transmissão de cepas patogênicas nas unidades de saúde, pois estão em contato direto com o meio ambiente, equipamentos e pacientes colonizados, o que facilita a transmissão cruzada e o risco de desenvolvimento de infecções subsequentes (CUSTOVIC et al., 2014). Conforme a OMS, aproximadamente 70% dos profissionais de saúde não praticam a higienização das mãos como rotina (WHO, 2017). No estudo de coorte prospectivo de Thom e colaboradores (2017), 77 cepas *A. baumannii* (30%) foram recuperados de mãos e luvas de profissionais de saúde em um hospital de Baltimore, no estado americano de Maryland. Desse modo, pacientes colonizados caracterizam um fator de risco, pois atuam como fonte de patógenos que poderão ser transmitidos a outros pacientes internados numa mesma unidade ou enfermaria hospitalar (SCARCELLA; SCARCELLA; BERETTA, 2017). Portanto, a higienização das mãos é uma das medidas de prevenção e controle das infecções (VIEIRA; PICOLI, 2015) (Tabela 2).

Tabela 2 - Métodos de controle e prevenção de infecções por *Acinetobacter* multirresistente.

Método	Especificações
Controle do ponto de origem	Deteccão da origem é efetiva no cenário de surtos
Precauções padrão	Higiene das mãos e o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs)
Limpeza e desinfecção ambiental	Contaminação ambiental generalizada é frequentemente relatada em cenário epidêmico e reservatórios ambientais provavelmente desempenham um papel neste panorama
Coorte de pacientes	Agrupar pacientes colonizados e infectados em uma unidade específica
Coorte da equipe médica	Designar equipe médica para cuidar apenas de pacientes colonizados ou infectados
Isolamento clínico	Requerido em alguns casos de surtos a fim de interromper a transmissão e permitir a completa desinfecção ambiental
Administração de antimicrobianos	Programas para promover o uso criterioso de antimicrobianos a fim de prevenir a emergência de mecanismos de resistência
Vigilância epidemiológica	Identificação de pacientes colonizados ou infectados para que as intervenções possam ser implementadas

Fonte: Adaptado de Vieira e Picoli (2015).

Outra estratégia empregada no monitoramento de IRAS por *Acinetobacter* multirresistentes é o uso de vigilância epidemiológica no rastreamento das bactérias, haja vista o fornecimento de informações sobre as tendências de um microrganismo quanto a aquisição de resistência, bem como sua distribuição nas unidades de saúde e capacidade de colonizar e produzir infecções e/ou óbitos (VIEIRA; PICOLI, 2015). Essa visão epidemiológica da unidade hospitalar é possibilitada pela realização de análises microbiológicas, a partir de amostras de swab coletados das superfícies hospitalares de comum acesso, como paredes e mesas, de dispositivos médicos e de mãos dos profissionais do corpo clínico (CUSTOVIC et al., 2014). Além disso, amostras de swab também são coletados de pacientes de sítios anatômicos variados, facilitando, portanto, a triagem dos que se encontram colonizados por *A. baumannii* e, por conseguinte, a implementação de medidas de prevenção e controle de surtos e infecções (BLANCO-LOBO et al., 2016).

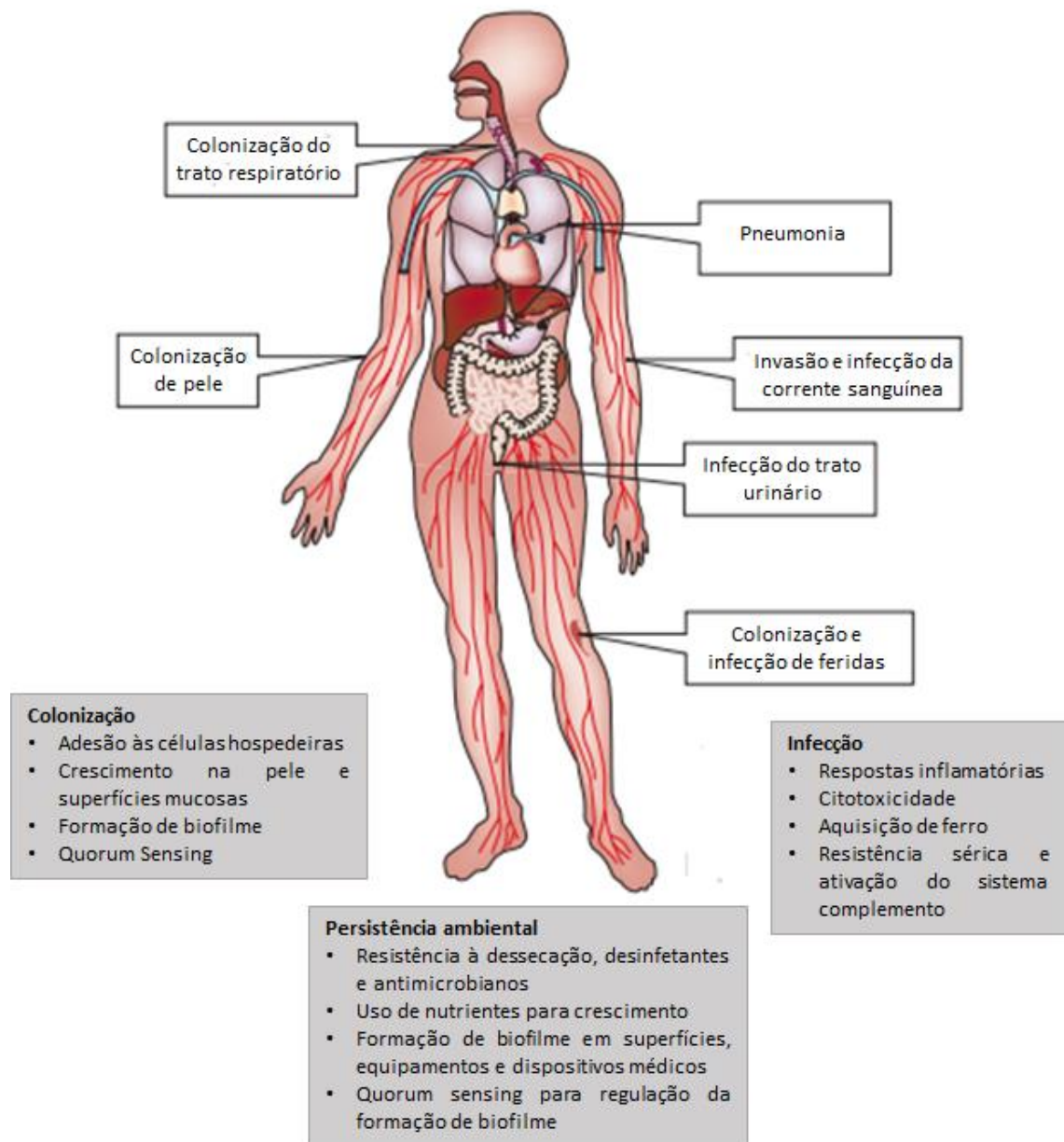
Durante períodos de surtos, determinadas cepas epidêmicas de CRAB já foram isoladas de swab da pele e swab retal de pacientes. Esse fato relaciona o papel da colonização de pacientes hospitalizados com a disseminação do microrganismo (MARTINS; BARTH, 2013).

Gramatniece e colaboradores (2019) relataram o controle de um surto numa UTI neonatal provocado por *A. baumannii* após adoção de culturas de vigilância das IRAS associada a descontaminação ambiental. Nesses casos de surtos, a realização de métodos de tipagem molecular, como a análise do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) torna-se útil e valioso, pois possibilita a investigação e identificação da relação genética entre as cepas patogênicas que estão transitando no ambiente hospitalar, e auxilia, consequentemente, no controle e no monitoramento da disseminação bacteriana nas unidades de saúde (FALAH; SHOKOOHIZADEH; ADABI, 2019; HEIDARI et al., 2018).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE

De acordo com Imperi e colaboradores (2011), *Acinetobacterbaumannii* desenvolveu três propriedades básicas para se adaptar ao ambiente hospitalar: resistência aos agentes antimicrobianos, capacidade de colonização da pele, dispositivos intravasculares e membranas mucosas e sobrevivência no hospedeiro humano. Evidências circunstanciais sugeriram que a resistência antimicrobiana é a principal vantagem seletiva que impulsiona a rápida disseminação de linhagens clonais, podendo contribuir para o aumento da patogenicidade de surtos (IMPERI et al., 2011). Alguns possíveis mecanismos da colonização, infecção e disseminação da epidemia por *Acinetobacter baumannii* estão resumidas na figura 2.

Figura 2 - Mecanismos da colonização, infecção e disseminação de *Acinetobacter baumannii*.

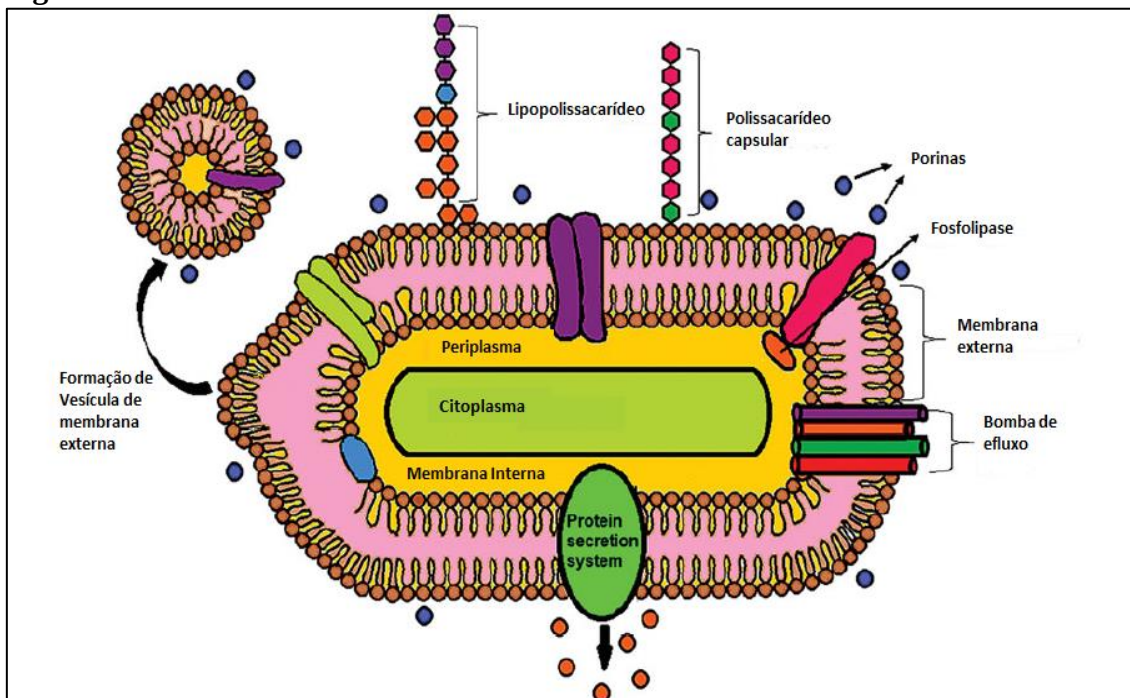


Fonte: Adaptação de Dijkshoorn; Nemec e Seifert (2007).

A combinação de análises de modelos fenotípicos, genômicos e de infecção têm auxiliado na identificação de fatores de virulência implicados na patogenicidade de *A. baumannii*, os quais estão ilustrados na figura 3 (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014). Esses fatores de virulência incluem a capacidade de aderência e interação com diferentes tipos de superfícies para formação de biofilmes, habilidade de captação de ferro pelo sideróforo, porinas, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos (LPS), enzimas hidrolíticas, como as

fosfolipases C e D que são responsáveis pela sobrevivência no soro humano e invasão de células epiteliais e os sistemas de secreção de proteínas propostos na patogênese de *A. baumannii* para colonização e aderência às células do hospedeiro através do pili (McCONNELL; ACTIS; PACHON, 2013; ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; LEE et al., 2017; BHAGIRATH et al., 2019).

Figura 3 - Fatores de virulência de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: Adaptado de Skariyachan e colaboradores (2019).

Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa é uma bicamada lipídica e desempenha papel fundamental na interação patógeno-hospedeiro. Ela é constituída de porinas que são proteínas de membrana externa (OMPs) associadas à modulação da permeabilidade celular (BHAGIRATH et al., 2019).

Nas cepas de *A. baumannii*, a proteína de membrana externa A (OmpA) é uma porina trimérica de 38 kDa e um fator de virulência reconhecido e bem caracterizado, que atua como uma molécula de adesão entre o patógeno e as células epiteliais humanas e induz a formação de biofilme (THUMMEEPK et al., 2016). OmpA também induz a apoptose celular através da produção de citocromo C, favorece a resistência sérica apresentada por cepas de *A. baumannii*, bem como contribui na resistência intrínseca aos antimicrobianos, pois, como canais de difusão, facilita a extrusão de antimicrobianos do espaço periplasmático através da membrana externa

(LEE et al., 2017; BHAGIRATH et al., 2019). Por ter origem nas superfícies celulares, a OmpA também tem função na regulação da biogênese das vesículas de membrana externa (OMVs). Outras porinas como Omp-33-36 e a proteína da membrana externa associada a carbapenêmico (CarO) são fatores descritos na patogenicidade de *A. baumannii* associados passagem de água e a resistência a carbapenêmicos (LEE et al., 2017).

Outros componentes associados a virulência e patogênese em *A. baumannii* são os exopolissacarídeos capsulares (EPS) e os lipopolissacarídeos, que são sintetizados no citoplasma e translocados para o exterior da membrana externa (LEE et al., 2017; MORRIS et al., 2019). Assim como a OmpA, os LPS são relevantes na resistência sérica e na evasão da resposta imune ao hospedeiro, uma vez que induz a liberação do fator de necrose tumoral e da interleucina-8 nos macrófagos (SKARIYACHAN et al., 2019). Já os EPS são compostos de subunidades de oligossacarídeos de repetição (unidades K) e formam uma discreta camada na superfície bacteriana, a qual fornece proteção contra variações nas condições ambientais, como também auxiliam na evasão das defesas imunológicas do hospedeiro e aumentam a resistência aos antimicrobianos. Em *A. baumannii*, a glicosilação de proteínas contribui para a formação e a maturação inicial de biofilmes (SINGH; ADAMS; BROWN, 2019).

Os sistemas de secreção transportam proteínas do periplasma para o espaço extracelular (SKARIYACHAN et al., 2019). *Acinetobacter* spp. codifica diversos sistemas de secreção, cada qual com sua importância na patogenicidade dessa espécie bacteriana. Como uma das proteínas secretadas de forma diferenciada pelo sistema de secreção tipo 1 (T1SS) é um homólogo da proteína associada ao biofilme em estafilococos (Bap), os autores testaram o papel desse sistema na formação de biofilme. De fato, o mutante T1SS apresentou um fenótipo mais fraco em relação a formação de biofilme, confirmando o papel de T1SS na virulência nas cepas de *Acinetobacter* spp. (ELHOSSEINY; AHMED; 2018). Além disso, a expressão de sistemas de bombas de efluxo, tais como AdeFGH, AdeABC, AdeIJK e AdeM foi associada à resistência a múltiplos fármacos e a patogenicidade em *A. baumannii* (SHAL et al., 2013). No estudo de He e colaboradores (2015), a superexpressão da bomba de efluxo AdeFGH acelerou as interações celulares que resultou no aumento da formação de biofilme.

A maioria dos fatores de virulência pressupostos para *A. baumannii* é conservada nas espécies patogênicas do complexo ACB, haja vista a relação genética entre essas espécies, juntamente com suas similaridades fenotípicas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). Entretanto, nenhum desses fatores de virulência em caráter individual explica o potencial

clínico da patogenicidade dessas cepas, reforçando, assim, a tese da combinação multifatorial na virulência de *A. baumannii* (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014). Segundo Harding, Hennon e Feldman (2017), a compreensão atual quanto à virulência de *A. baumannii* sugere numa estratégia de "persistir e resistir", especificamente, e a cepa de *A. baumannii* tem uma capacidade notável de sobreviver em condições de estresse.

2.3.1 Formação de biofilme

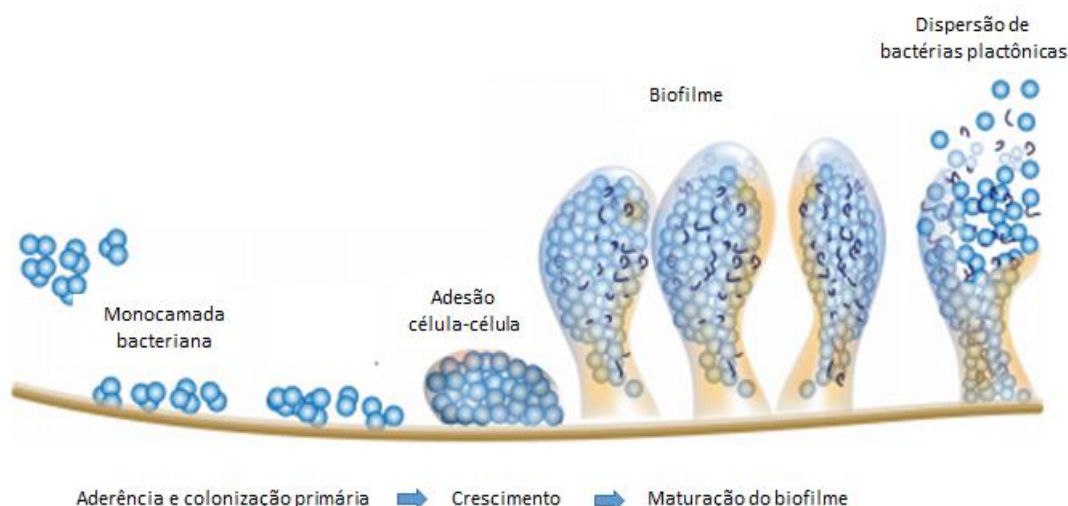
Segundo Thummeepak e colaboradores (2016), a capacidade de formação de biofilme das bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. é um dos principais fatores de virulência envolvidos na resistência bacteriana a antimicrobianos, na persistência nas infecções crônicas e na sobrevivência das cepas em condições de estresse ambiental. O biofilme consiste em uma comunidade microbiana ligada à superfície, envolvida por uma matriz extracelular, através da síntese de substâncias poliméricas, tais como proteínas, exopolissacarídeos e ácidos nucleicos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; SIVARANJANI et al., 2018).

A formação de biofilmes ocorre em três etapas: aderência e colonização, formação de matriz e maturação (Figura 4) (AZIZI et al., 2016). Na fase inicial da formação de biofilme, as bactérias se aderem à superfície, num processo e se dividem a partir das microcolônias. Estas se fundem em grandes agregados, deixando canais abertos para permitir a passagem de fluidos contendo nutrientes. À medida que o biofilme envelhece, as células sésseis tornam-se cobertas com a matriz polimérica e exopolissacarídica, comportando-se como barreira de difusão contra agentes antibacterianos, células fagocitárias e contra a atividade bacteriana do soro sérico (REENA; SUBRAMANIYAN; KANUNGO, 2017). As características fenotípicas e genotípicas do biofilme são desencadeadas pelo *quorum sensing* (QS), ou seja, um modo de comunicação entre as células bacterianas, via moléculas de sinal conhecidas como “autoindutores”, que são produzidas pelas bactérias ao longo do seu crescimento. Essa comunicação célula a célula é dependente da densidade celular e auxilia na adaptação bacteriana às mudanças em vários fatores ambientais, tais como temperatura, nível de oxigênio, acidez e a qualidade do meio de crescimento (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; SAIPRIYA et al., 2020).

Desse modo, o aumento das interações celulares, através do aumento da detecção de lactonas N-acil-homoserina (AHLs) que é um autoindutor, resulta na aceleração da formação

de biofilme mediada por vias QS (HE et al., 2015). Conforme Azizi e colaboradores, 2016, a lactona N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina (AHL-12) ativa funções relevantes para a defesa de células fagocíticas, que inclui o aumento da fagocitose, aumento da expressão de receptores de adesão e indução de quimiotaxia. Isso leva à hipótese de que o reconhecimento precoce de biofilmes em desenvolvimento pode ser a chave para uma defesa bem-sucedida do hospedeiro contra infecções por biofilme (AZIZI et al., 2016).

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de formação de biofilme.



Fonte: Adaptação de Mermel (2014).

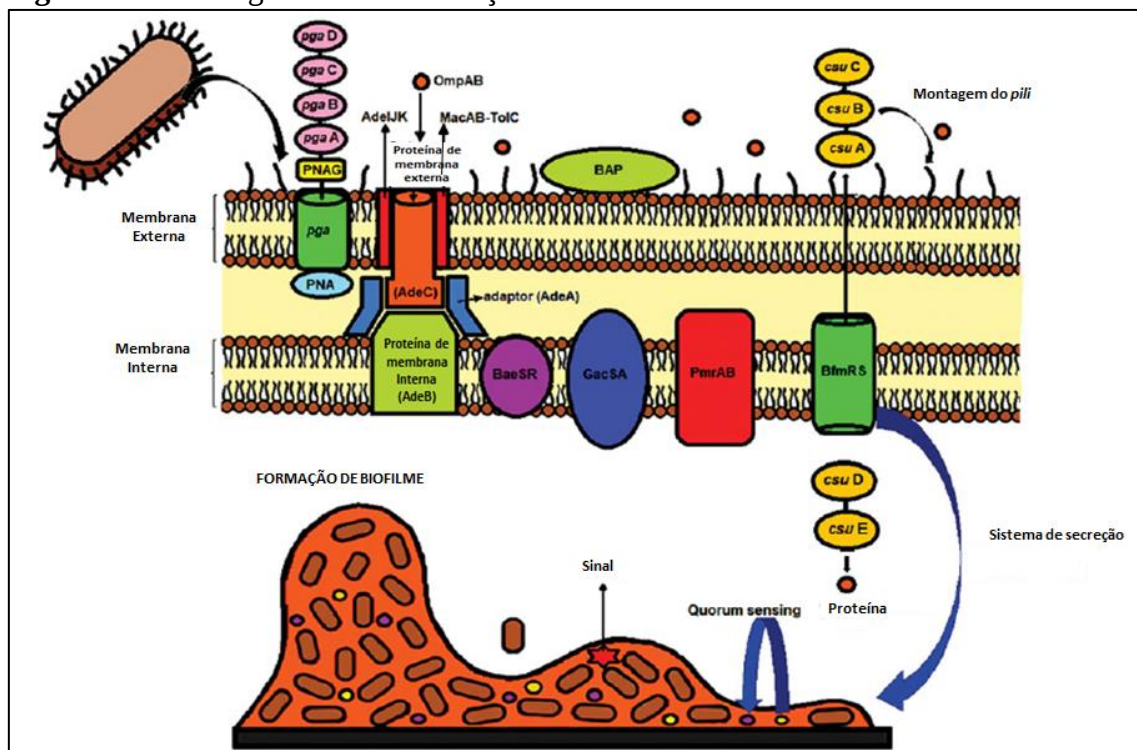
Os biofilmes são estruturas dinâmicas, nas quais as transições entre os modos de crescimento planctônico e sésil ocorrem em resposta a diferentes sinais ambientais. As células de *A. baumannii* quando em biofilme, comparadas com células planctônicas, mostraram uma maior organização no metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, motilidade, transporte ativo, metilação de DNA, aquisição de ferro, regulação transcricional e *quorum sensing* (RUMBO-FEAL et al., 2013).

As infecções associadas a dispositivos médicos por *A. baumannii* são frequentemente relacionadas à formação de biofilme em superfícies abióticas, como intubação endotraqueal e cateteres vasculares, o que favorece a sobrevivência desse microrganismo, aumentando, assim, os riscos de infecções respiratórias e da corrente sanguínea (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2008; RUMBO-FEAL et al., 2013). Já nas infecções da pele e dos tecidos moles, *A. baumannii* forma biofilmes, tanto em feridas como nos curativos oclusivos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017).

2.3.1.1 Genes de virulência

A capacidade de adesão bacteriana, formação e desenvolvimento de biofilme envolvem redes regulatórias complexas que coordenam a expressão temporal de genes relacionados à adesão, motilidade e síntese de componentes da matriz (RUMBO-FEAL et al., 2013). Até o momento, uma matriz de genes determinantes de virulência relacionados ao biofilme nesse patógeno incluem o sistema de pili *CsuA/BABCDE*, regulado por um sistema de dois componentes (*BfmS/BfmR*), a proteína de membrana externa *OmpA*, a proteína associada à formação de biofilme (*Bap*), os autoindutores de sintase *AbaI*, parte do sistema *quorum sensing* e o operon *pgaABC* responsável pela produção de poly- β -1,6-*N*-acetilglucosamina (PNAG) (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; THUMMEEPK et al., 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Rede regulatória da formação de biofilme de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: Skariyachan e colaboradores (2019).

A maioria das cepas de *A. baumannii* codifica e produz um sistema de pili *CsuA/BABCDE*, também designado por *Csu pili*, que é regulado por um sistema de dois componentes *bfmRS*, e são relevantes para a formação e manutenção de biofilme em superfícies inanimadas, como poliestireno, mas não são necessários para a associação com superfícies

bióticas, como células epiteliais humanas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). O gene *csuE* codifica parte do sistema de montagem do Csu pili e age como uma adesina de ligação à superfície, contribuindo, assim, para a formação de biofilme (TURTON et al., 2007; PAKHARUKOVA et al, 2018). Além disso, o sistema BfmR/BfmS consiste em um sensor-quinase que detecta as condições ambientais e um regulador de resposta (ZEIGMANI et al., 2019). De acordo com Liou e colaboradores (2014), o *bfmS* inativado reduziu a formação de biofilme em *A. baumannii* ATCC 17978. Esse sistema tem sido considerado alvo potencial de fármacos, conforme estudo de Russo e colaboradores (2016), que relatou que a inibição do BfmR aumentou significativamente a suscetibilidade de *A. baumannii* em relação aos antimicrobianos.

Nas cepas de *A. baumannii*, a OmpA é uma porina codificada pelo gene *ompA*, e tem várias funções na patogênese bacteriana, como na adesão e formação de biofilme, resistência antimicrobiana, entre outras (LEE et al., 2017; SIVARANJANI et al., 2018). A interrupção do gene *ompA* diminuiu as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicrobianos cloranfenicol, aztreonam e ácido nalidíxico, o que sugere que OmpA participa da expulsão de antibióticos do espaço periplasmático através de sistemas de bomba de efluxo (SMANI et al., 2014). Em consonância com o potencial antibiofilme da xantona natural α -mangostina, Sivarajani e colaboradores (2018) observaram que a redução no nível de expressão do gene *ompA in vitro* configurou dificuldade de adesão de *A. baumannii*. Nesse sentido, a OmpA é um alvo atraente para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e estratégias de prevenção terapêutica (LEE et al., 2017).

Um passo crítico na colonização dos tecidos do hospedeiro é a aderência às células eucarióticas e pode, portanto, ser considerado um dos primeiros passos na progressão da doença (EIJKEKAMP et al., 2014). A proteína Bap, codificada pelo gene *bap*, é uma adesina de superfície que medeia a ligação primária às superfícies bióticas e abióticas e está envolvida na adesão intercelular dentro do biofilme maduro (RUMBO-FEAL et al., 2013). O desempenho na formação de biofilme foi demonstrado por Loehfelm e colaboradores (2008), cuja mutação do gene *bap* na *A. baumannii* em análise ocasionou diminuição na espessura e no volume do biofilme. Esses dados sugerem que a proteína Bap é um componente-chave na formação de biofilme em *A. baumannii* e pode ter participação na persistência da bactéria nas infecções em ambiente hospitalar (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012).

A síntese de substâncias poliméricas extracelulares, que consiste principalmente em polissacarídeos, ácidos nucléicos, lipídios e proteínas é determinante durante a formação de biofilme. Essas substâncias poliméricas preenchem o espaço intercelular de agregados bacterianos que, por sua vez, fornecem uma estrutura tridimensional e uma arquitetura complexa para a matriz de biofilme. A EPS produzida pela *A. baumannii* é codificada pelo gene *epsA*. A produção de EPS está envolvida na adesão célula-superfície e célula-célula, bem como protege as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (THUMMEEPK et al., 2016). Portanto, inibir a produção de EPS pode aumentar a suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos e facilitar a inibição da formação de biofilme (SIVARANJANI et al., 2018).

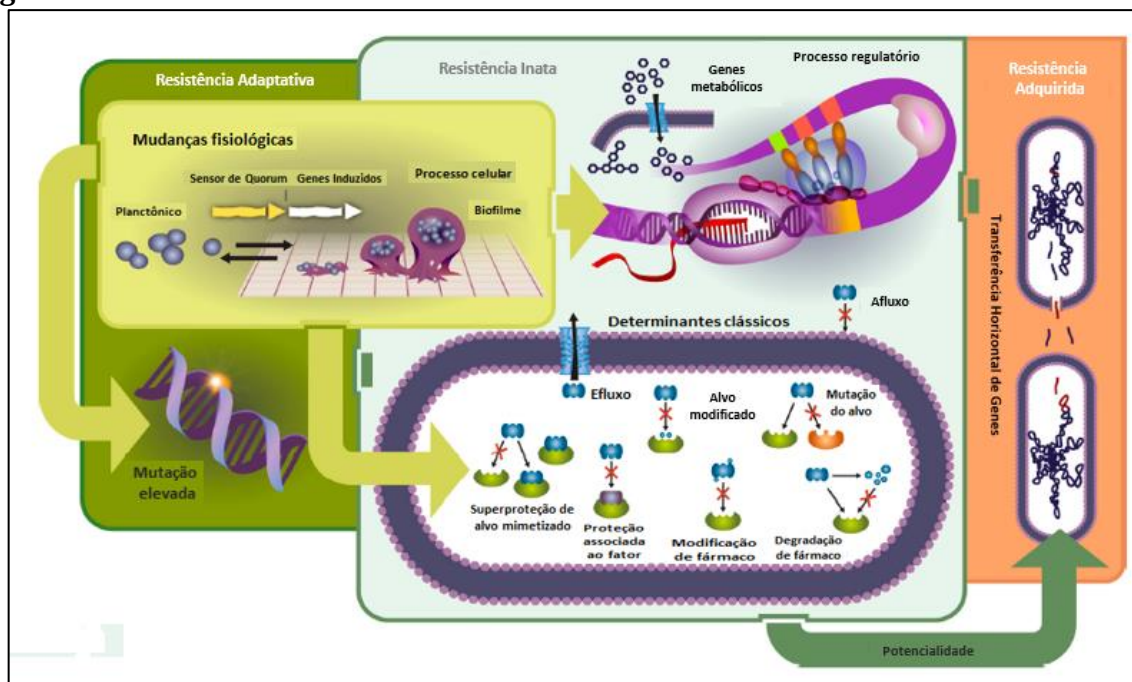
2.4 RELAÇÃO ENTRE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Uma das principais preocupações acerca da patogenicidade de *A. baumannii* é a sua resistência aos antimicrobianos (SHAL et al., 2013). Portadores de resistência intrínseca aos antimicrobianos, as cepas de *Acinetobacter* spp. apresentam alta plasticidade gênica e são capazes de transferir material genético, especialmente genes de resistência antimicrobiana, possibilitando, assim a aquisição de novos mecanismos de resistência (ALMASAUDI, 2018). Outro processo clinicamente relevante na virulência de *A. baumannii* é a capacidade de formação de biofilme que, uma vez produzido, pode proporcionar as cepas uma maior resistência aos agentes antimicrobianos, bem como pode favorecer a colonização e constituir uma fonte de infecção persistente no ambiente hospitalar (REENA; SUBRAMANIYAN; KANUNGO, 2017).

Os biofilmes bacterianos são inerentemente mais resistentes aos antimicrobianos (SCHROEDER; BROOKS; BROOKS, 2017). Fallah e colaboradores (2017) ao compararem a resistência antimicrobiana à capacidade de formação de biofilme nas 100 amostras clínicas de *A. baumannii* observaram que em 43 isolados (43%) com o fenótipo fortemente aderente quanto a formação de biofilme, 41 desses isolados (95,3%) eram cepas MDR. Ademais, os biofilmes também facilitam a transferência horizontal de genes de virulência e de resistência antimicrobiana compartilhados entre as bactérias que compõem essa comunidade microbiana. Esse processo é acelerado quando submetido a estresse ambiental, como na presença de um antimicrobiano, por exemplo, haja vista o exercício da pressão antimicrobiana

na seleção de bactérias com fenótipos multirresistentes (SCHROEDER; BROOKS; BROOKS, 2017) (Figura 6).

Figura 6 - Transmissão de mecanismos de resistência antimicrobiana e virulência.



Fonte: Schoeder; Brooks; Brooks (2017).

Devido ao crescimento da resistência aos antimicrobianos, o tratamento de infecções por *A. baumannii* está se tornando um sério problema de saúde (LIU et al., 2018). No momento, os antimicrobianos de escolha para a terapêutica de casos de infecção por *A. baumannii* são os carbapenêmicos (LANNAN et al., 2016; SILVA; DOMINGUES, 2019). Entretanto, o aumento da incidência de relatos de infecção hospitalar por cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos já é uma realidade, bem como o surgimento de cepas extensivamente resistentes a medicamentos (LANNAN et al., 2016). Com isso, a utilização de polimixinas e tigeciclina na prática clínica consiste no último recurso terapêutico para o tratamento de infecção por *A. baumannii* multirresistente (AMIN et al., 2019).

Todavia, estudos mostram que há cepas de CRAB com resistência as polimixinas (NEVES et al., 2016). Conforme Srinivas e Rivard (2019), a terapia combinada de polimixina com outro agente antimicrobiano seria uma condição terapêutica viável para evitar o desenvolvimento de resistência. Nesse caso, os carbapenêmicos são os antimicrobianos mais comumente avaliados para terapia combinada com a polimixina (SRINIVAS; RIVARD, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão fenotípico da formação de biofilme em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de infecção e de colonização de um hospital público de Recife-PE, coletados nos anos de 2018 e 2019, além de pesquisar a ocorrência dos genes de virulência (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*) e descrever a relação clonal entre os isolados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o perfil fenotípico da formação de biofilme dos isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de infecção e de colonização;
- ✓ Determinar a ocorrência dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* nos isolados de *Acinetobacter* spp. de infecção e de colonização;
- ✓ Caracterizar o perfil de susceptibilidade frente a diversos antimicrobianos e determinar a concentração inibitória mínima de polimixina B dos isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de infecção e de colonização;
- ✓ Correlacionar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de infecção e de colonização ao perfil fenotípico da produção de biofilme;
- ✓ Verificar a frequência dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* nos isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de infecção e de colonização e correlacionar ao perfil fenotípico da formação de biofilme;
- ✓ Determinar o perfil clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo descritivo de base laboratorial, que visou determinar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos, a caracterização fenotípica da produção de biofilme, junto com a caracterização molecular da frequência da ocorrência dos genes de virulência (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*) dos isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de amostras de infecção e de colonização de pacientes internados em um hospital público em Recife, Pernambuco, durante o período de 2018 a 2019.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no qual foram realizados os testes fenotípicos e moleculares dos isolados, em colaboração com o setor de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os isolados de *Acinetobacter* spp. de infecção e colonização foram fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia de um hospital público em Recife-Pernambuco, durante o período de novembro de 2018 a janeiro de 2019.

4.4 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

a) Variáveis relacionadas às características dos isolados

As definições de infecção e colonização seguiram os critérios adotados pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital, haja vista que os isolados de *Acinetobacter* spp. disponibilizados

para esse estudo foram entregues previamente identificados. Infecção: Categorizada como 1; Colonização: Categorizada como 2.

Sítio de coleta do material: Tipo de material coletado para cultura bacteriana. Variável coletada no laudo do exame bacteriológico. Aspirado traqueal: Categorizado como 1; Sangue: Categorizado como 2; Swab retal: Categorizado como 3; Urina: Categorizada como 4; Ponta de cateter venoso central: Categorizada como 5; Outros: Categorizado como 6.

Unidade de internação: Setor hospitalar de acomodação do paciente. UTI: Categorizada como 1; Emergência geral: Categorizada como 2; Unidade coronariana: Categorizada como 3; Enfermaria cardiológica: Categorizada como 4; Outros: Categorizados como 5.

b) Variáveis relacionadas à caracterização fenotípica dos microrganismos

A definição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana seguiu a classificação de Magiorakos e colaboradores (2012). Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram considerados MDR quando apresentaram resistência a um ou mais fármaco de pelo menos três classes de antimicrobianos (incluindo aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas), enquanto foram considerados MDS os isolados que apresentaram resistência a duas ou menos classes de antimicrobianos. Além disso, os isolados clínicos foram considerados extensivamente resistentes aos medicamentos (XDR) quando apresentaram resistência a um ou mais fármaco de quase todas as classes de antimicrobianos, exceto duas ou menos classes. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos: MDR: Categorizado como 1; MDS: Categorizado como 2; XDR: Categorizado como 3.

Para avaliação do perfil fenotípico da produção de biofilme foi adotado o valor das densidades óticas para cada isolado (DOi), segundo classificação de Stepanovic e colaboradores (2000). Não aderente: Categorizado como (-); Fracamente aderente: Categorizado como (+); Moderadamente aderente: Categorizado como (++); Fortemente aderente: Categorizado como (+++).

c) Variáveis relacionadas à caracterização genética dos isolados

Tabela 3 - Variáveis relacionadas à caracterização genética dos genes de virulência.

Variável	Definição	Categorização
<i>epsA</i>	Gene relacionado à adesão e formação de biofilme, identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>ompA</i>	Gene relacionado à adesão celular, formação de biofilme, resistência sérica, apoptose, imunomodulação e resistência antimicrobiana, identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>csuE</i>	Gene relacionado à adesão e formação de biofilme, identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bap</i>	Gene relacionado à adesão e formação de biofilme, identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bfmS</i>	Gene relacionado à formação de biofilme e resistência antimicrobiana, identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente

4.5 PADRONIZAÇÃO E TÉCNICAS LABORATORIAIS

4.5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *Acinetobacter* spp. fornecidos pelo Laboratório do Hospital foram identificados e classificados quanto o perfil de susceptibilidade antimicrobiana através da realização do sistema automatizado BD Phoenix[®], sendo classificados como MDR, MDS ou XDR. Os antimicrobianos testados nesse estudo foram amicacina, cefepime, ceftazidima,

ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, piperacilina/tazobactam e a trimetoprima + sulfametoxazol, conforme painel BD Phoenix[®]. Posteriormente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B dos isolados de *Acinetobacter* spp. através da técnica de microdiluição em caldo, conforme os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2019).

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, onde foram mantidos conservados em glicerol a -80°C na coleção bacteriana do laboratório. Essas bactérias foram reativadas em tubos de ensaio contendo meio caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubadas por 48 horas em estufa a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, semeadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas.

Para a determinação da CIM, caldo Müeller-Hinton de cátion ajustado (CAMHB) foi distribuído em placas de microdiluição com 96 poços. A polimixina B foi distribuída nas placas para obter a faixa de concentração de 0,125 a 32 µg/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram preparadas em CAMHB, utilizando-se as colônias dos isolados que foram previamente semeadas em BHI. Após incubação a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 20 a 24 horas, a turbidez destas suspensões foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland e posteriormente, alíquotas foram adicionadas nos poços das placas de 96 poços, para obtenção de uma concentração final de $2-5 \times 10^5$ UFC/poço. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 20 a 24 horas. Como controles, utilizou-se a cepa *Escherichia coli* NCTC 13846 como controle positivo e as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo. Todos os isolados foram testados em triplicata (CLSI, 2019).

Para leitura das placas, após o período de incubação, foram adicionados, em cada poço, 20 µL de resazurina a 0,01%, corante de viabilidade celular. As placas foram reincubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 1 hora e a mudança da coloração do poço de azul fracamente fluorescente para rosa fluorescente caracterizou positividade para o crescimento bacteriano. A interpretação dos valores das CIMs foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI, com modificações (CLSI, 2019).

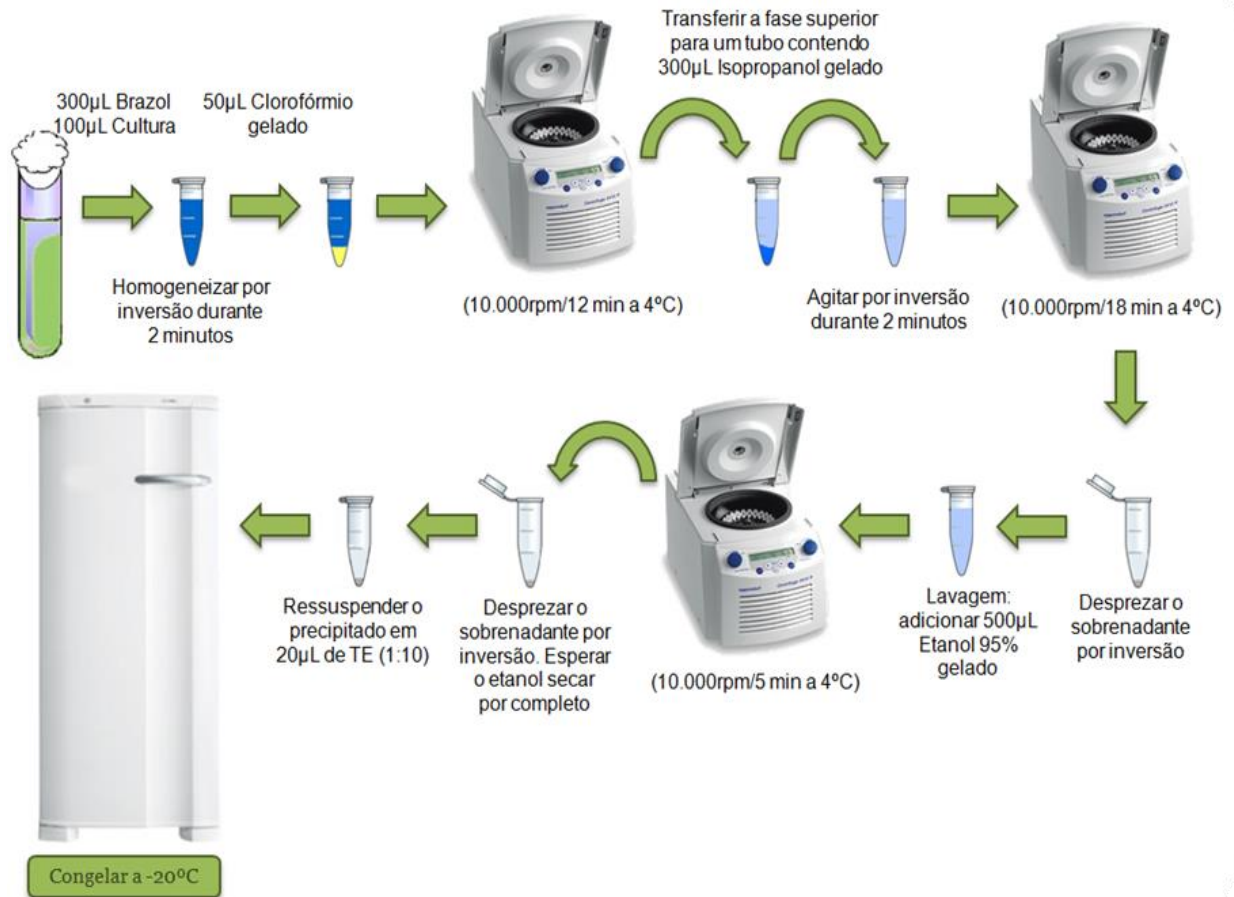
4.5.2 Caracterização fenotípica da produção de biofilme

Para a detecção da produção de biofilme foi utilizado o método da coloração com cristal violeta segundo Stepanović e colaboradores (2000). Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram cultivados em Caldo Soja Trypticaseína (TSB) a 35 ± 2 °C por 24 horas. Para microtitulação foram utilizadas placas de poliestireno, contendo 96 poços de fundo plano, onde foram aplicados 200 µL das suspensões bacterianas na escala 0,5 de McFarland, em triplicata, sendo utilizado como controle negativo o caldo TSB sem inóculo bacteriano. Como controle positivo foi utilizada a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. As placas foram então incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Após este período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavado por três vezes com 250 µL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µL de metanol a 99% por 15 minutos. O metanol foi removido; as placas foram postas em temperatura ambiente para secagem e, posteriormente, coradas com 200 µL de solução de cristal violeta 1% durante 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após este processo, realizou-se a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550) em comprimento de onda de 570nm. O valor das densidades óticas para cada isolado (DOi) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DOc). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das densidades óticas (DO) relacionada com os resultados obtidos para a DOc. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente se $DOi \leq DOc$; fracamente aderente (+) se $DOc < DOi \leq 2 \times DOc$; moderadamente aderente (++) se $2 \times DOc < DOi \leq 4 \times DOc$; ou fortemente aderente (+++) se $4 \times DOc < DOi$.

4.5.3 Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo LB a 35 ± 2 °C por 24 horas, foi realizada a extração do DNA total dos isolados clínicos MDR detectados no teste BD Phoenix®. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante (Figura 7). O DNA extraído foi quantificado (NanoDrop 2000c, Thermoscientific®), sendo armazenado posteriormente a -20°C.

Figura 7 - Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.



Fonte: JÁCOME, 2011.

4.5.4 Identificação molecular do *Acinetobacter baumannii*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para a identificação da espécie *A. baumannii* entre os isolados de *Acinetobacter* spp. utilizando o primer *bla_{oxa-51-like}* (F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG), de acordo com a descrição de Woodford e colaboradores (2006). A cepa controle foi cedida pelo Dr. Danilo Elias Xavier, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fiocruz, Pernambuco.

4.5.5 Detecção dos genes de virulência

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram realizadas para detecção dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* em isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de

amostras de colonização e de infecção, de acordo com a metodologia descrita pelos artigos referenciados para cada gene, conforme a tabela 2. Os *primers* desses genes, que foram utilizados nas reações e o tamanho dos fragmentos em pares de base (pb), estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Lista de *primers* para a pesquisa dos genes de virulência em *Acinetobacter* spp.

Genes	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>epsA</i>	F: AGCAAGTGGTTATCCAATCG R: ACCAGACTCACCCATTACAT	451	Tayabali et al., 2012
<i>ompA</i>	F: CGCTTCTGCTGGTGCTGAAT R: CGTGCAGTAGCGTTAGGGTA	531	Tayabali et al., 2012
<i>bap</i>	F: TACTTCCAATCCAATGCTAGGGAGGGTACCAATGCAG R: TTATCCACTTCCAATGATCAGCAACCAAACCGCTAC	1225	Goh et al., 2013
<i>bfmS</i>	F: TTGCTCGAACTTCCAATTTATTATAC R: TTATGCAGGTGCTTTTTTATTGGTC	1368	Liou et al., 2014
<i>csuE</i>	F: ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC R: CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG	976	Turton et al., 2007

F: forward, R: reverse, pb: pares de base.

Cada reação de PCR dos referidos genes foi preparada em um volume final de 25 µL por tubo que incluiu 20 ng (2 µL) do DNA total, 15 pmol (1 µL) de cada *primer*, 0,6 µL de trifosfato de desoxirribonucleotídeo (dNTP) (8 mM), 5,0 mL de tampão (5×), 2,0 mL de MgCl₂ (25 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U). Para os genes *bap* e *csuE*, utilizou-se as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 96 ° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 96 ° C, anelamento de 1 min a 56,5 ° C (gene *bap*) e 57 ° C (gene *csuE*), extensão de 1 min a 72 ° C e extensão final a 72 ° C por 10 min.

Para os genes *ompA*, *bfmS* e *epsA*, as condições de ciclagem foram desnaturação inicial a 94 ° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 ° C, anelamento de 1 min a 55 ° C, extensão por 45 s a 72 ° C e extensão final a 72 ° C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5×, após aplicação do corante *blue-green*, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotodocumentados. A cepa *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle positivo.

4.5.6 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com *blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (DUAN et al., 2009).

A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software Past. A similaridade adotada para definir a relação clonal entre as cepas de *Acinetobacter* spp. foi igual ou superior a 85%.

4.5.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Graphpad prism 8.3.1. A descrição da amostra foi feita pela frequência com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}). A diferença da biomassa do biofilme entre os isolados de infecção e colonização foi comparada usando o teste t de Student. O teste Qui-Quadrado foi usado para analisar diferenças entre frequências dos genes de virulência em relação à formação de biofilme. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.5.8 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS/UFPE) número CAAE 0490.0.172.000-11.

5 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico, que será submetido à Revista Brasileira de Terapia Intensiva (Impresso) (Anexo A).

5.1 ARTIGO: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS GENES DE VIRULÊNCIA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE *Acinetobacter* spp. MULTIDROGA-RESISTENTES

1 Introdução

O gênero *Acinetobacter* é constituído por cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, imóveis, não fermentadores de glicose, catalase positivos e oxidase negativos ⁽¹⁾. Dentre as 63 espécies com nomes válidos, *Acinetobacter baumannii* é o patógeno mais relevante clinicamente e, juntamente com as espécies *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijksboorniae* compõe o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), sendo um potencial patógeno de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) ^(2, 3).

As cepas de *Acinetobacter* spp., em especial as de *Acinetobacter baumannii*, são consideradas uma ameaça à saúde pública no cenário global, principalmente devido à sua propensão para adquirir mecanismos de resistência, o que favorece a sua sobrevivência sob pressão seletiva de antimicrobianos, propiciando, assim, a disseminação de cepas multirresistentes ⁽⁴⁾. No Brasil, identificou-se que a taxa de resistência de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos foi de 77,7% nas UTIs adulto, sendo essa a maior taxa observada entre os bacilos Gram-negativos ⁽⁵⁾. Além disso, *Acinetobacter* spp. tem a habilidade para produzir biofilmes, que é um dos principais fatores de virulência envolvidos na resistência bacteriana a antimicrobianos, bem como facilita a colonização bacteriana, complicações no tratamento das infecções e a persistência de patógenos em ambientes hospitalares e dispositivos médicos ⁽¹⁾.

O biofilme consiste em uma comunidade microbiana ligada à superfície envolvida por uma matriz extracelular ⁽⁶⁾. Essa capacidade de adesão bacteriana, formação e desenvolvimento

de biofilme envolvem redes regulatórias complexas que coordenam a expressão temporal de genes relacionados à adesão, motilidade e síntese de componentes da matriz ⁽⁷⁾. Entre os genes determinantes de virulência relacionados ao biofilme em *Acinetobacter* spp., pode-se destacar os genes *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* ^(8, 9).

A produção do pili é primordial para a formação do biofilme ⁽¹⁰⁾. Essa estrutura é formada através do sistema de secreção pili CsuA/BABCDE, regulado pelo sistema de dois componentes *bfmRS*, e que são relevantes para a formação e manutenção de biofilme de *Acinetobacter* spp. em superfícies inanimadas ⁽¹¹⁾. O gene *csuE* codifica parte do sistema de montagem do Csu pili e age como uma adesina de ligação à superfície no início do processo de formação do biofilme ⁽¹²⁾. Além disso, a proteína OmpA, dentre outras funções na patogênese bacteriana, age na adesão entre o patógeno e as células epiteliais humanas, e o exopolissacarídeo extracelular (EPS), codificado pelo gene *epsA*, também está envolvido na adesão célula-superfície e célula-célula, além de proteger as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ambos atuam na indução da formação de biofilme ⁽⁸⁾.

A proteína Bap, codificada pelo gene *bap*, é uma adesina de superfície que está envolvida na adesão intercelular em biofilme maduro e no volume da biomassa. Essa proteína é considerada um componente-chave na formação de biofilme em *A. baumannii* e pode ter participação na persistência do processo infeccioso provocado pela bactéria ⁽⁷⁾.

Em *A. baumannii*, a prevalência dos casos de colonização são maioria em relação aos casos de infecção ⁽¹³⁾. Essa alta capacidade colonizadora combinada com a multirresistência frente aos antimicrobianos nesse microrganismo constituem fatores predisponentes ao desenvolvimento ou agravamento de infecções relacionadas à saúde, como também favorece a sobrevivência do patógeno e sua disseminação na unidade hospitalar ^(14, 15).

Portanto, o presente estudo objetivou caracterizar fenotipicamente a produção de biofilme por isolados clínicos de *Acinetobacter* spp provenientes de infecção e colonização, além de pesquisar a ocorrência dos genes de virulência (*bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*) e descrever a relação clonal entre os isolados.

2 Métodos

2.1 Isolados bacterianos

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram provenientes de pacientes internados em vários setores de um hospital público na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, sendo coletados de amostras de culturas de vigilância e de sítios de infecção durante o período de novembro de 2018 a janeiro de 2019. As definições de colonização e infecção seguiram os critérios clínicos e microbiológicos do hospital. Os isolados clínicos foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE, onde foram conservados em glicerol e mantidos em estoque a -80°C .

Essas bactérias foram reativadas em tubos de ensaio contendo meio caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubadas por 48 horas em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, semeadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em relação a identificação bacteriana, os isolados de *Acinetobacter* spp. foram fornecidos previamente identificados pelo sistema automatizado BD Phoenix[®] e, posteriormente, submetidos à identificação molecular através da detecção do gene *bla_{oxa-51-like}* para confirmação da espécie *A. baumannii*, de acordo com Woodford e colaboradores⁽¹⁶⁾. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Ética da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde número CAAE 0490.0.172.000-11.

2.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A análise da susceptibilidade dos isolados foi realizada através do sistema automatizado BD Phoenix[®]. Os isolados foram considerados multidroga-resistentes (MDR) quando apresentaram resistência a pelo menos três classes de fármacos a partir de uma variedade de classes de antimicrobianos (principalmente aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas), multidroga-sensíveis (MDS) com resistência a duas ou menos classes de antimicrobianos ou extensivamente resistentes a medicamentos (XDR) quando apresentaram resistência a um ou mais fármacos de quase todas as classes de antimicrobianos, exceto duas ou menos classes de antimicrobianos⁽¹⁷⁾. Os antimicrobianos testados nesse estudo foram amicacina, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, piperacilina/tazobactam e a trimetoprima

+ sulfametoxazol, conforme painel BD Phoenix[®]. Posteriormente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da polimixina B dos isolados de *Acinetobacter* spp. através da técnica de microdiluição em caldo, conforme os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ⁽¹⁸⁾. Como controles, utilizou-se a cepa *Escherichia coli* NCTC 13846 como controle positivo e as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo. Todos os isolados foram testados em triplicata ⁽¹⁸⁾.

2.3 Caracterização fenotípica da produção de biofilme

Para a avaliação da produção de biofilme foi utilizado o método da coloração com cristal violeta segundo Stepanović e colaboradores ⁽¹⁹⁾. Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram cultivados em Caldo Soja Trypticaseína (TSB) a 35 ± 2 °C por 24 horas. Para microtitulação foram utilizadas placas de poliestireno, contendo 96 poços de fundo plano, onde foram aplicados 200 µL das suspensões bacterianas na escala 0,5 de McFarland, em triplicata, sendo utilizado como controle negativo o caldo TSB sem inóculo bacteriano. Como controle positivo foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606. As placas foram então incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Após este período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavado por três vezes com 250 µL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µL de metanol a 99% por 15 minutos. O metanol foi removido; as placas foram postas em temperatura ambiente para secagem e, posteriormente, coradas com 200 µL de solução de cristal violeta 1% durante 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após este processo, realizou-se a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550) em comprimento de onda de 570nm. O valor das densidades óticas para cada isolado (DOi) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DOc). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das densidades óticas (DO) relacionada com os resultados obtidos para a DOc. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente se $DOi \leq DOc$; fracamente aderente (+) se $DOc < DOi \leq 2 \times DOc$; moderadamente aderente (++) se $2 \times DOc < DOi \leq 4 \times DOc$; ou fortemente aderente (+++) se $4 \times DOc < DOi$.

2.4 Extração de DNA total

Após incubação dos isolados em caldo Luria Bertani (LB) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, a extração de DNA total foi realizada utilizando o kit Brazol (LGC-Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado (NanoDrop 2000c, Thermoscientific®), sendo armazenado posteriormente a -20°C .

2.5 Detecção dos genes de virulência

A presença dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS* foi detectada através de reações em cadeia da polimerase (PCRs) com os *primers* e as condições de amplificação, conforme demonstra a Tabela 1. Cada reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 μL por tubo que incluiu 20 ng (2 μL) do DNA total, 15 pmol (1 μL) de cada *primer*, 0,6 μL de trifosfato de desoxirribonucleotídeo (dNTP) (8 mM), 5,0 mL de tampão (5 $\times$), 2,0 mL de MgCl_2 (25 mM), 0,2 μL de *Taq* DNA Polimerase (5U). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 0,5 $\times$, após aplicação do corante *blue-green*, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotodocumentados. A cepa *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1 - Lista de *primers* e as condições de amplificação para a pesquisa dos genes de virulência em *Acinetobacter* spp.

Gene	Sequência de oligonucleotídeo (5'-3')	Condições de amplificação	Amplicon (pb)	Referência
<i>bap</i>	F: TACTTCCAATCCAATGCTAGGGAGGGTACCAATGCAG R: TTATCCACTTCCAATGATCAGCAACCAAACCGCTAC	Desnaturação inicial 96 °C, 5 min, 35x: 96 °C, 1 min; 56,5 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, Extensão final: 72 °C, 10 min	1225	(20)
<i>csuE</i>	F: ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC R: CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG	Desnaturação inicial 96 °C, 5 min, 35x: 96 °C, 1 min; 57 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, Extensão final: 72 °C, 10 min	976	(12)
<i>ompA</i>	F: CGCTTCTGCTGGTGCTGAAT R: CGTGCAGTAGCGTTAGGGTA	Desnaturação inicial 94 °C, 5 min, 35x: 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 45 seg, Extensão final: 72 °C, 5 min	531	(21)
<i>bfmS</i>	F: TTGCTCGAACTTCCAATTTATTATAC R: TTATGCAGGTGCTTTTTTATTGGTC	Desnaturação inicial 94 °C, 5 min, 35x: 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 45 seg, Extensão final: 72 °C, 5 min	1368	(22)
<i>epsA</i>	F: AGCAAGTGGTTATCCAATCG R: ACCAGACTCACCCATTACAT	Desnaturação inicial 94 °C, 5 min, 35x: 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 45 seg, Extensão final: 72 °C, 5 min	451	(21)

F: forward, R: reverse, pb: pares de base.

2.6 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

A pesquisa da relação genética entre os isolados foi realizada através da técnica de ERIC-PCR. As reações foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com *blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados ⁽²³⁾. A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software Past. A similaridade adotada para definir a relação clonal entre as cepas de *Acinetobacter* spp. foi igual ou superior a 85%.

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Graphpad prism 8.3.1. A descrição da amostra foi realizada pela frequência com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}). A diferença da biomassa do biofilme entre os isolados de infecção e colonização foi comparada usando o teste t de Student. O teste Qui-Quadrado foi usado para analisar diferenças entre frequências dos genes de virulência em relação à formação de biofilme. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3 Resultados

Foram estudados 38 isolados de *Acinetobacter* spp. de pacientes internados em um hospital público de Recife-PE, Brasil, entre os anos de 2018 e 2019. Dentre os isolados, 20 foram provenientes de infecção, sendo 45% (9/20) isolados de secreção traqueal, 30% (6/20) de sague, 20% (4/20) de ponta de cateteres e 5% (1/20) de urina. Os 18 isolados restantes foram provenientes de culturas de vigilância, sendo 94,44% (17/18) isolados de swab retal e 5,56% (1/18) de swab nasal, caracterizados como isolados de colonização. A espécie *Acinetobacter*

baumannii foi identificada em 81,58% (31/38) dos isolados nesse estudo, através da verificação da presença do gene *bla_{OXA-51-like}*. As sete cepas negativas para o gene *bla_{OXA-51-like}* foram identificadas como complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), conforme análise do BD Phoenix.

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Acinetobacter* spp. pode ser visualizado na figura 1. Todos os 38 isolados apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima e ceftriaxona), piperacilina / tazobactam, fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino) e aos carbapenêmicos (imipinem e meropenem). Com base no perfil de resistência, 86,85% (33/38) dos isolados nesse estudo foram caracterizados como MDR. Tanto os isolados de infecção como os de colonização apresentaram taxa de resistência igual ou superior a 80% à amicacina e à cefepime. Além disso, os valores da faixa da CIM da polimixina B, determinada pelo método de microdiluição em caldo, variou de 0,125 a 32 µg / mL, sendo assim 85% (17/20) e 88,88% (16/18) dos isolados de infecção e de colonização sensíveis a polimixina B, respectivamente. Com isso, embora a maioria dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. apresentou inibição ao crescimento bacteriano frente a polimixina B na concentração de 0,25 a 1 µg/mL, 15% (3/20) dos isolados de infecção e 11,11% (2/18) dos isolados de colonização foram resistentes a polimixina B e classificados como isolados XDR.

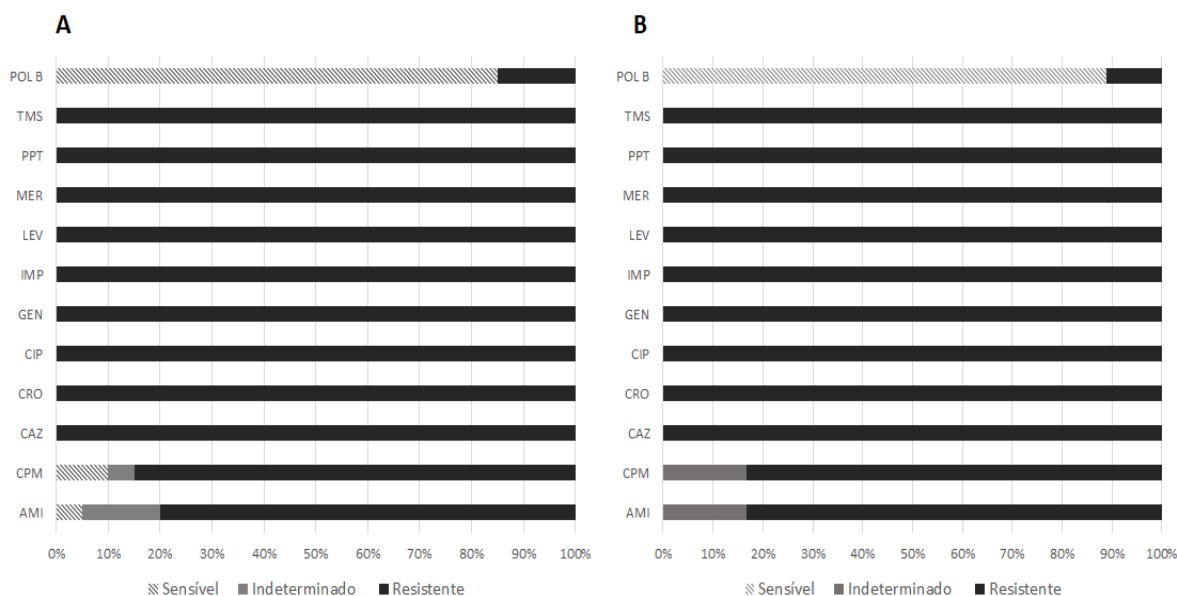


Figura 1. Perfis de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Acinetobacter* spp. em Recife – PE. (A) Isolados provenientes de infecção e (B) Isolados provenientes de colonização. AMI: amicacina; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; CPM: cefepime; CAZ: ceftazidime; CRO: ceftriaxone; PPT: piperacilina/tazobactam; TRI/SUL: trimetoprima + sulfametoxazol; POL B: polimixina B.

A avaliação do perfil fenotípico de formação de biofilme dos isolados de *Acinetobacter* spp. demonstrou que todos os 38 isolados analisados foram capazes de produzir biofilme com diferentes intensidades de aderência. A comparação da formação de biofilme entre os isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de infecção e de colonização, de acordo com a categorização da intensidade de aderência do biofilme, não apresentou significância estatística pelo teste t de Student ($p = 0,378$; IC95% -0,015 – 0,039), como se visualiza na figura 2. Entre os 20 isolados de infecção, 5 (25%) foram caracterizados como fracamente aderentes (3 MDR e 2 XDR), 11 (55%) como moderadamente aderentes (11 MDR) e 4 (20%) como fortemente aderentes (3 MDR e 1 XDR). Em relação aos 18 isolados de colonização, 6 (33,33%) foram categorizadas como fracamente aderentes (5 MDR e 1 XDR), 10 (55,56%) como moderadamente aderentes (9 MDR e 1 XDR), e 2 (11,11%) como fortemente aderentes (2 MDR).

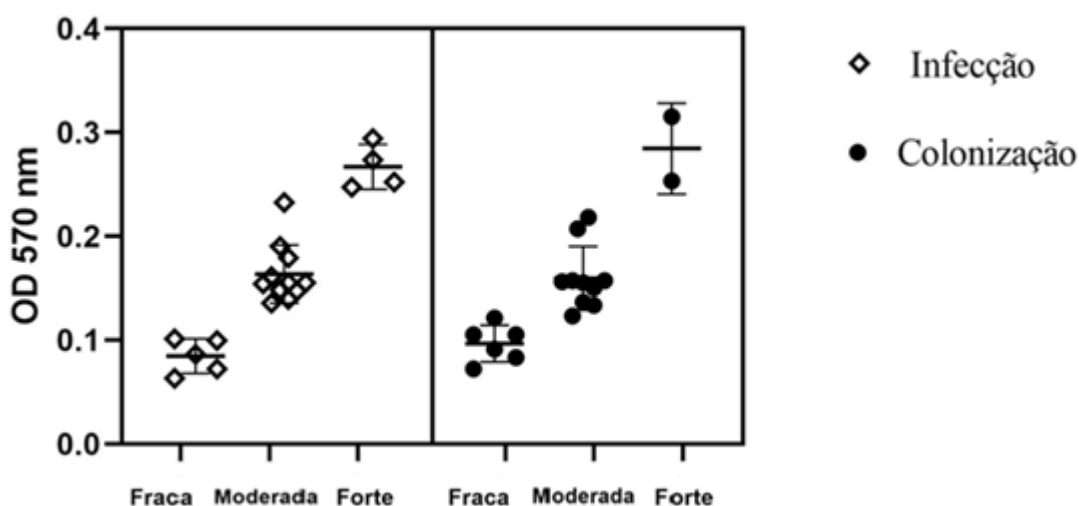


Figura 2 – Comparação do perfil fenotípico da formação de biofilme dos isolados de *Acinetobacter* spp. distribuídos entre isolados de infecção e colonização em Recife– PE.

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença estatística significativa na correlação do perfil de resistência do microrganismo com a capacidade de formação de biofilme pelo teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$). Tanto os isolados de infecção quanto os de colonização apresentaram o perfil fenotípico da produção de biofilme fraco, moderado e forte com percentuais similares e o perfil de resistência antimicrobiana XDR (Figura 3).

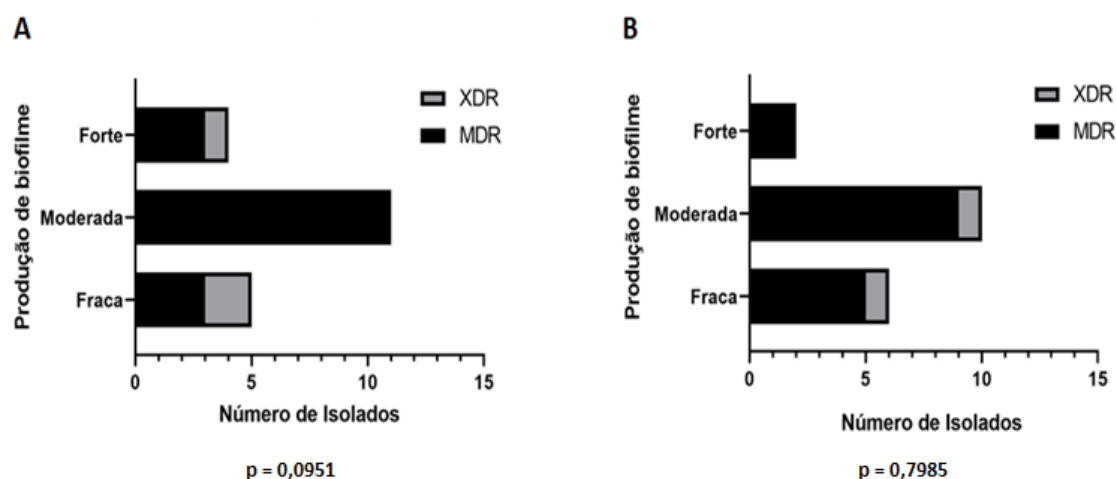


Figura 3 – Correlação da formação de biofilme e o perfil de resistência dos isolados de *Acinetobacter* spp. em Recife – PE. (A) Isolados provenientes de infecção e (B) Isolados provenientes de colonização.

A amplificação por PCR para a detecção dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *csuE*, *bfmS* e *epsA* indicou que todos os 38 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. carregavam, pelo menos, um desses genes de virulência relacionados à formação de biofilme. O gene mais prevalente foi o *bap*, presente em todos os 38 isolados de *Acinetobacter* spp. A ocorrência dos genes *ompA*, *csuE*, *bfmS* e *epsA* entre os isolados de infecção foi de 95% (19/20), 85% (17/20), 70% (14/20) e 65% (13/20), respectivamente. Entre os isolados de colonização, a frequência dos genes de virulência foi de 94,44% (17/18) para *ompA* e *csuE*, seguido de 61,11% (11/18) para *bfmS* e *epsA*. Dos 5 genes de virulência estudados, 85% (17/20) dos isolados de infecção e 94,44% (17/18) dos isolados de colonização coexistiam os genes *bap*, *ompA* e *csuE* em seu perfil genético.

Da mesma forma, não houve significância entre as amostras de infecção e de colonização quando comparados o perfil fenotípico da produção de biofilme às frequências dos genes de virulência *bap*, *ompA*, *epsA*, *csuE* e *bfmS*, pelo teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$) (Figura 4).

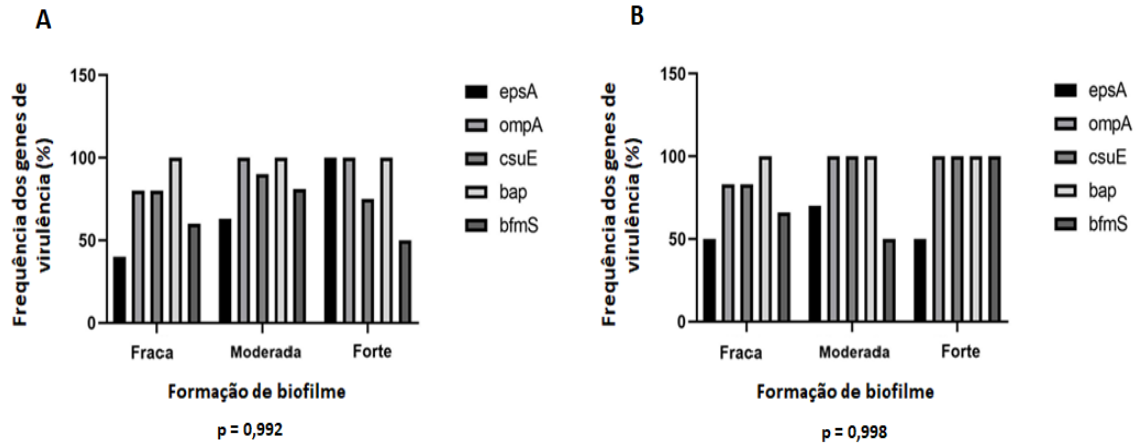


Figura 4 – Comparação da formação de biofilme e frequências dos genes de virulência dos isolados de *Acinetobacter* spp. em Recife – PE. (A) Isolados provenientes de infecção e (B) Isolados provenientes de colonização.

No presente estudo, a genotipagem de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. por ERIC-PCR mostrou 38 perfis genéticos distintos, com similaridade variando de 20% a 75% (Figura 5).

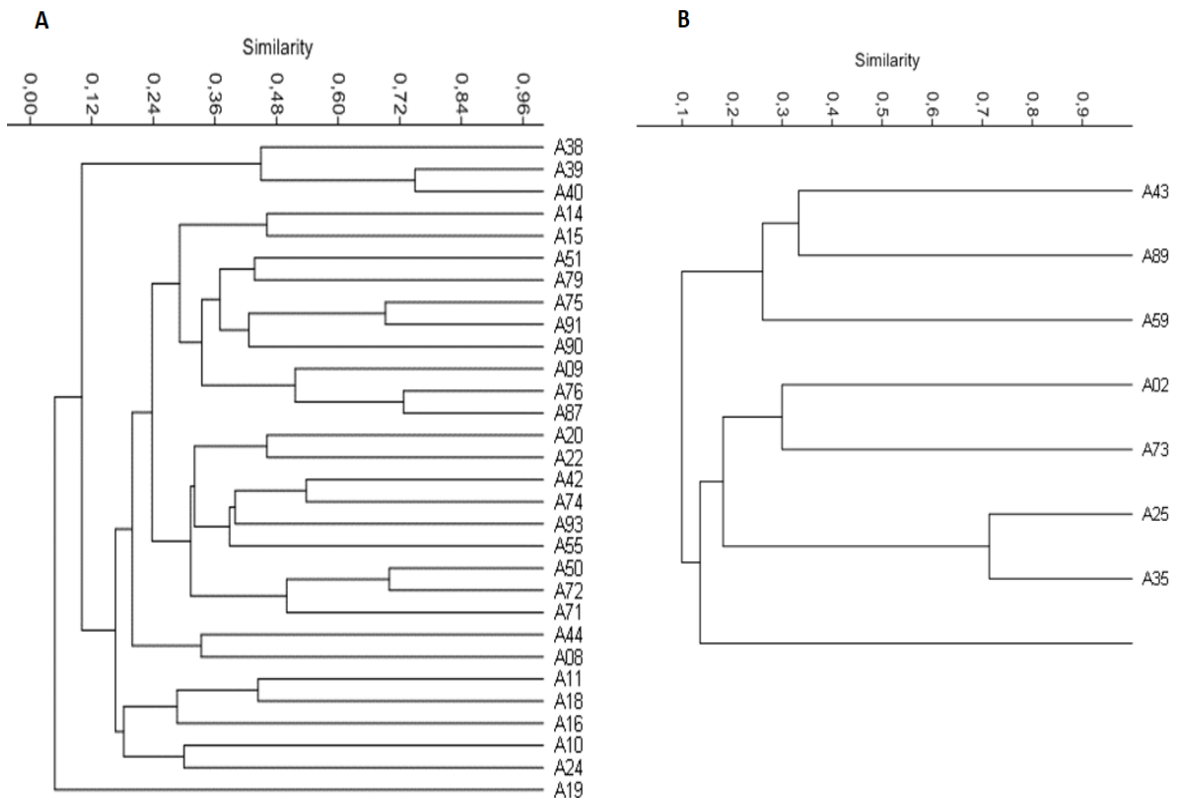


Figura 5 – Dendrograma relativo aos padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. em Recife – PE. (A) Isolados de *Acinetobacter baumannii* e (B) Isolados de Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.

4 Discussão

A incidência de IRAS causadas por espécies do gênero *Acinetobacter* está aumentando no cenário mundial e, apesar de incluir mais de 50 espécies nomeadas, *Acinetobacter baumannii* é o patógeno predominantemente isolado dos pacientes em ambiente hospitalar ^(24, 25). Neste estudo, mediante a abordagem fenotípica e molecular do gene *bla*_{OXA-51-like}, 81,58% (31/38) dos isolados foram identificados como *A. baumannii* e 18,42% (7/38) como complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB). Em 2019, Falah, Shokoohizadeh e Adabi ⁽²⁶⁾ relataram que 97,56% (80/82) dos isolados de *A. baumannii* identificados por testes fenotípicos e bioquímicos eram portadores do gene *bla*_{OXA-51}, confirmando, assim, a identificação dos isolados como *A. baumannii*.

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana revelou que 86,85% (33/38) dos isolados de *Acinetobacter* spp. eram MDR. Todos os 38 isolados estudados foram resistentes às cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aos carbapenêmicos, que são considerados os fármacos de escolha terapêutica nas infecções por *A. baumannii* ^(10, 27). Tanto os isolados de infecção quanto os de colonização apresentaram taxa de resistência igual ou superior a 80% à amicacina e à cefepime. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente por vários estudos de diferentes países, inclusive no Brasil ^(14, 28, 29, 30).

Esse perfil de resistência antimicrobiana apresentado por bacilos Gram-negativos, como *Acinetobacter* spp., é preocupante para a saúde pública em todo o mundo, pois a medida que se eleva o isolamento de cepas resistentes aos carbapenêmicos, limitam-se as opções de tratamento disponíveis, o que induz a necessidade de novas abordagens terapêuticas, como as polimixinas (colistina e polimixina B) ⁽²⁸⁾. Neste estudo, embora mais de 85% dos isolados tenham sido sensíveis à polimixina B, foi detectado que 15% (3/20) dos isolados de infecção e 11,11% (2/18) dos isolados de colonização foram resistentes a esse antimicrobiano e classificados, por conseguinte, como isolados XDR. Há uma incidência variada de resistência à polimixina B em isolados de *Acinetobacter* spp. no Brasil. Romanin e colaboradores ⁽³¹⁾ indicaram que 10,7% (11/103) dos isolados de *A. baumannii*, isolados de amostras de sangue de pacientes internados em um hospital em Londrina, foram resistentes à polimixina B. Em contrapartida, Siqueira e colaboradores ⁽³²⁾ identificaram que todas as 68 cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas em um hospital no Espírito Santo, obtidas de amostras de urina, sangue e secreções, foram susceptíveis à polimixina B.

A análise fenotípica da capacidade de formação de biofilme indicou que todos os 38 isolados de *Acinetobacter* spp. deste estudo eram produtores de biofilme, com percentuais de perfis fenotípicos de fraco, moderado e fortemente aderentes similares entre os isolados provenientes de infecção e de colonização. Zeighami e colaboradores ⁽⁹⁾ demonstraram que todos os isolados clínicos de *A. baumannii* obtidos de amostras de sangue, secreção torácica e urina eram capazes de produzir de biofilme; no entanto, 58% (58/100) de seus isolados se mostraram fortemente aderentes, enquanto este estudo verificou apenas 20% (5/20) entre os isolados de infecção e 11,11% (2/18) entre os isolados de colonização. Além disso, não houve diferença nas médias das DO do biofilme, quando comparadas entre os isolados agrupados conforme a fonte de isolamento (infecção e colonização). De modo similar, ao investigar a formação fenotípica de biofilme em isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* no Irã, Ghasemi e colaboradores ⁽³³⁾ também não detectaram disparidade quanto a formação de biofilme com base no tipo de amostra, apesar das amostras ambientais apresentarem maior capacidade de produção de biofilme que as amostras clínicas, o que pode reforçar a potencialidade colonizadora dessa bactéria.

Segundo Schroeder, Brooks e Brooks ⁽³⁴⁾, a virulência bacteriana abrange não apenas a possibilidade de colonização de um hospedeiro, mas também a capacidade de causar doenças, e a formação de biofilme é uma parte essencial da patogenicidade bacteriana com evidências de que o seu desenvolvimento proporciona maior resistência aos antimicrobianos. Enquanto alguns autores encontraram uma relação positiva entre o perfil MDR dos isolados de *A. baumannii* e uma maior capacidade de formação de biofilme ^(14, 28, 35), outros indicaram a relação inversa, em que a alta formação de biofilme é maior entre os isolados de *A. baumannii* de perfil não-MDR ^(10, 36). Embora existam relatos divergentes quando se relaciona o perfil de resistência e biofilme, este estudo não observou relação significativa entre o perfil de resistência do microrganismo e a capacidade de formação de biofilme entre os isolados de *Acinetobacter* spp., assim como os resultados de Lima e colaboradores ⁽³⁰⁾, cuja análise de 35 cepas de *Acinetobacter baumannii* recuperadas de secreção traqueal, urina, líquido cefalorraquidiano e sangue revelou que 24 isolados (68,6%) eram fortes produtores de biofilme (23 XDR e um não-MDR), 10 isolados (28,6%) eram produtores moderados (9 XDR e 1 não-MDR), e apenas 1 isolado (2,9%) era um fraco produtor de biofilme, com um perfil XDR. Lima e colaboradores ⁽³⁰⁾.

Entre os genes de virulência envolvidos na produção de biofilme, o gene *bap* foi o mais prevalente neste estudo experimental, presente em todos os 38 isolados de *Acinetobacter* spp.

A alta prevalência do gene *bap* também foi relatada por Goh e colaboradores ⁽²⁰⁾ e Liu e colaboradores ⁽³⁷⁾, que detectaram o gene *bap* em 91,7% (22/24) e 95,5% (84/88) das cepas de *A. baumannii*, respectivamente, e indicaram a importância da proteína associada ao biofilme (Bap), expressa na superfície celular, na contribuição da formação de biofilme *in vitro*.

No presente trabalho, a ocorrência dos genes *csuE*, *ompA*, *epsA* e *bfmS* apresentou altas taxas de frequência entre os isolados de *Acinetobacter* spp. Enquanto a prevalência dos genes *ompA* e *csuE* foi de 85% a 95%, a prevalência dos genes *bfmS* e *epsA* variou de 61,11% a 70%, com frequências semelhantes entre os isolados de infecção e colonização. O gene prevalente no estudo de Zeigmani e colaboradores ⁽⁹⁾ foi o *csuE*, presente em todos os 100 isolados de *A. baumannii* avaliados, corroborando com percentuais elevados dos nossos resultados. Em 2016, Thummeepak e colaboradores ⁽⁸⁾ descreveram a distribuição dos genes de virulência *ompA*, *bfmS* e *epsA* em isolados de *A. baumannii* com frequência de 84,4% (190/225), 84% (189/225) e 22,2% (50/225), respectivamente, e revelou alta prevalência de perfis fenotípicos formadores de biofilme entre os seus isolados.

Ao analisar a correlação entre a formação de biofilme e os genes de virulência relacionados, Yang e colaboradores ⁽³⁵⁾ sugeriram que as cepas de *A. baumannii* portadoras dos genes *bap*, *ompA* e *csuE* tenderiam a produzir biofilme mais fortemente aderente que os isolados sem esses genes. Embora os genes *bap*, *ompA* e *csuE* tenham coexistido em 85% (17/20) dos isolados de infecção e em 94,44% (17/18) dos isolados de colonização, este estudo não encontrou correlação significativa entre a formação de biofilme e a ocorrência dos genes de virulência, nem diferença estatística quando comparados os isolados de infecção e colonização.

De acordo com a condição de formação do biofilme, os produtos genéticos expressos por genes são cruciais para a adesão e o desenvolvimento do biofilme, sendo um fator determinante na epidemiologia das infecções causadas por *Acinetobacter* spp.⁽³²⁾. Liou e colaboradores ⁽³⁸⁾ demonstraram, por exemplo, que o gene mutante *bfmS* diminuiu a formação de biofilme, reduziu a aderência às células e a sensibilização à morte sérica do *A. baumannii*. Nesse caso, a identificação prévia de genes de virulência em amostras de colonização contaminadas por cepas de *Acinetobacter* spp. pode ser um indicativo de risco à infecção em pacientes colonizados por isolados virulentos com capacidade de formação de biofilme, haja vista que, na maioria dos casos de surtos relacionados a *A. baumannii*, os pacientes colonizados são, em geral, fontes de transmissão inicial ⁽²⁶⁾.

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para investigação da relação filogenética entre os isolados. Esse método de tipagem molecular foi realizado por ser rápido, de fácil execução e confiável na elucidação epidemiológica das cepas que circulam no ambiente hospitalar ⁽¹⁰⁾. De acordo com os resultados, a ERIC-PCR mostrou diversidade genética e heterogeneidade entre os 38 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. avaliados, com similaridade variando de 20% a 75%, porém não foi identificado clone. Estudos anteriores relataram a identificação de perfis clonais em isolados de *Acinetobacter baumannii*, como Moreira e colaboradores ⁽³⁹⁾ que detectaram 17 grupos diferentes entre 48 isolados, Falah, Shokoohizadeh e Adabi ⁽²⁶⁾ que indicaram 14 padrões de ERIC-PCR entre 80 isolados e Heidari e colaboradores que identificaram 20 tipos ERIC-PCR entre 75 isolados. Paradoxalmente, apesar desses relatos de existência clonal na literatura, também é possível reconhecer o grau de diversidade clonal entre as cepas de *A. baumannii*.

5 Conclusão

No Brasil, há poucos relatos da análise da produção de biofilme e a detecção dos genes de virulência em cepas de *Acinetobacter* spp. O presente estudo demonstrou isolados de *Acinetobacter* spp. altamente resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo a resistência à polimixina B, bem como evidenciou a alta prevalência fenotípica de formação de biofilme, as frequências elevadas de genes de virulência e a heterogeneidade entre os isolados provenientes de infecção e de colonização. Além disso, embora a formação de biofilme não tenha tido correlação com o perfil de resistência das bactérias nem com o perfil molecular dos genes de virulência analisados, destacamos a similaridade dos padrões encontrados entre os isolados de infecção e de colonização, especialmente pelo fato de que a produção de biofilme em pacientes colonizados, como um mecanismo de virulência, pode favorecer o desenvolvimento de infecção. Desse modo, o monitoramento contínuo do perfil epidemiológico e de susceptibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos circulantes no ambiente hospitalar, através de culturas de vigilância, pode ser uma das estratégias para nortear a terapêutica bacteriana de IRAS e minimizar a propagação de cepas virulentas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco (Propesq/UFPE) e da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) [APQ-0814-4.03/17].

Referências

1. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae K, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
2. Vijayakumar S., Biswas IB., Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future Sci OA*, 2019; 5(6): FSO395.
3. Nemec A. et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Micr*, 2015; 65: 934–942.
4. Reena AAA, Subramaniyan A, Kanungo R. Biofilm formation as a virulence factor of *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogen in critical care units. *J Curr Res Sci Med*. 2017; 3: 74-8.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017. 6. Brasília: Anvisa; 2017. [capturado 16 dez 2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+Seguran%C3%A7a+do+Paciente+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n+17/c0d5caa9-45b9-4861-b07b-b82b40b3334f>.
6. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14 (9): 563-75.
7. Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, et al. Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS ONE*. 2013; 8 (8): e72968.
8. Thummeepak R, Kongthai P, Leungtonkam U, Sitthisak S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int Microbiol*. 2016;19 (2): 121-129.
9. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 2019; 19 (1): 629.
10. Amin M, Navidifar T, Shoostari FS, Rashno M, Savari M, Jahangirmehr F, Arshadi M. Association Between Biofilm Formation, Structure, and the Expression Levels of Genes Related to biofilm formation and Biofilm-Specific Resistance of *Acinetobacter*

- baumannii* Strains Isolated from Burn Infection in Ahvaz, Iran. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 3867-3881.
11. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16 (2): 91-102.
 12. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 (8): 807-15.
 13. Martins AF, Barth AL. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. Multidrugresistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. *Sci Med, Porto Alegre*, v. 23, n.1, p. 56–62, 2013.
 14. Badave GK, Kulkarni D. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9 (1): DC08-10.
 15. Ryu SY, Baek WK, Kim HA. Association of biofilm production with colonization among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Intern Med.* 2017; 32 (2): 345-351.
 16. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27 (4): 351-3.
 17. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 (3): 268-81.
 18. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
 19. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40 (2): 175-9.
 20. Goh HM, Beatson SA, Totsika M, Moriel DG, Phan MD, Szubert J, et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm associated protein. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79 (21): 6535-43.
 21. Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, Crosthwait J, Coleman G, Seligy VL. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PLoS One.* 2012;7(5):e37024.
 22. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014; 47 (4): 275-81.
 23. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res.* 2009; 109 (5): 511-7.
 24. Li XM, Choi JA, Choi IS, Kook JK, Chang YH, Park G, et al. Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species. *Ann Clin Lab Sci.* 2016; 46 (3): 270-8.

25. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin Microbiol Rev. 2017; 30 (1): 409-447.
26. Falah F, Shokoohizadeh L and Adabi M. Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. Scars, Burns & Healing, Volume 5, 2019. DOI: 10.1177/2059513118831369.
27. Silva GJ, Domingues S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. Antibiotics (Basel). 2017; 6 (4). pii: E28.
28. Duarte A, Ferreira S, Almeida S, Domingues FC. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2016; 45: 29-33.
29. Fallah A, Rezaee MA, Hasani A, Barhaghi MHS, Kafil HS. Frequency of *bap* and *cpaA* virulence genes in drug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their role in biofilm formation. Iran J Basic Med Sci. 2017; 20 (8): 849-855.
30. Lima AVA, da Silva SM, do Nascimento Júnior JAA, Correia MDS, Luz AC, Leal-Balbino TC, et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist. 2020 Jan 9. doi: 10.1089/mdr.2019.0214.
31. Romanin P, Palermo RL, Cavalini JF, Fávaro LDS, De Paula-Petroli SB, Fernandes EV, et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Hospital from Brazil: The Importance of Carbapenemase Encoding Genes and Epidemic Clonal Complexes in a 10-Year Study. Microb Drug Resist. 2019; 25 (9): 1365-1373.
32. Siqueira CCM, Guimarães AC, Mata TFD, Pratte-Santos R, Raymundo NLS, Dias CF, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of microorganisms in a university hospital from Vitória (ES), Brazil. J Bras Patol Med Lab. 2018; 54(2): 76-82.
33. Ghasemi E, Ghalavand Z, Goudarzi H, Yeganeh F, Hashemi A, et al. Phenotypic and Genotypic Investigation of Biofilm Formation in Clinical and Environmental Isolates of *Acinetobacter baumannii*, Arch Clin Infect Dis. 2018; 13 (4): e12914.
34. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. Genes (Basel). 2017;8 (1). pii: E39.
35. Yang Q, Schultz GS, Gibson DJ. A Surfactant-Based Dressing to Treat and Prevent *Acinetobacter baumannii* Biofilms. J Burn Care Res. 2018; 39 (5): 766-770.
36. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2016; 7: 483. doi: 10.3389/fmicb.2016.00483.
37. Liu H, Wu YQ, Chen LP, Gao X, Huang HN, Qiu FL, et al. Biofilm-Related Genes: Analyses in Multi- Antibiotic Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates From Mainland China. Med Sci Monit. 2016; 22: 1801-7.
38. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Immunol Infect. 2014; 47 (4): 275-81.

39. Moreira RRB, Viana GF, de Moraes ACC, de Souza Bastos M, Nishiyama SAB, Dos Anjos Szczerepa MM, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 in old and new intensive care units without transfer of colonized patients. Infect Control Hosp Epidemiol. 2018; 39 (9): 1135-1137.

6 CONCLUSÃO

- Todos os 38 isolados analisados foram capazes de produzir biofilme;
- Todos os 38 isolados de *Acinetobacter* spp. carregavam, pelo menos, um desses genes em seu perfil genético;
- O gene *bap* estava presente em 100% dos isolados de *Acinetobacter* spp. e a frequência dos genes *ompA*, *csuE*, *bfmS* e *epsA*, tanto nos isolados de infecção quanto de colonização, apresentou índices elevados, variando de 61,11% a 95% de presença;
- Detectou-se alta prevalência de resistência frente os antimicrobianos analisados, inclusive entre os carbapenêmicos imipinem e meropenem, sendo 86,85% (33/38) dos isolados de *Acinetobacter* spp. caracterizados multidroga-resistentes;
- A polimixina B foi o antimicrobiano mais sensível frente aos isolados clínicos analisados no estudo. Entretanto, pela análise da CIM, verificou-se resistência a esse antimicrobiano em 3 isolados provenientes de amostras de infecção e por 2 isolados provenientes de amostras de colonização;
- Não visualizou-se correlação da formação de biofilme com o perfil de resistência das bactérias nem com o perfil molecular dos genes de virulência investigados;
- Não houve indicativo da existência de clones entre os isolados de *Acinetobacter* spp. após análise dos padrões de banda pela técnica ERIC-PCR.

REFERÊNCIAS

- AL ALTROUNI, A. et al. Reservoirs of non-*baumannii* *acinetobacter* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 49, p. 1-12, 2016.
- ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n.3, p. 586–596, 2018.
- AMIN, M. et al. Association Between Biofilm Formation, Structure, and the Expression Levels of Genes Related to biofilm formation and Biofilm-Specific Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Burn Infection in Ahvaz, Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3867–3881, 2019.
- ANTUNES, L.C.S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, n.3, p. 292–301, 2014.
- ARAÚJO, B. T.; PEREIRA, D. C. R. Políticas para controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil, 2017. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 28, n.3, p. 333-342, 2017.
- ASIF, M; ALVI, I. A.; REHMAN, R. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1249–1260, 2018.
- AZIZI, O. et al. Molecular analysis and expression of *bap* gene in biofilm-forming multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**, v.5, n.1, p. 62-72, 2016.
- BADAVE, G. K; DHANANJAY, Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. V. 9, n. 1, p. 08-10, 2015.
- BAHADOR, A., et al. Association of virulence gene expression with colistin-resistance in *Acinetobacter baumannii*: analysis of genotype, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.17, n.24, p. 1-12, 2018.
- BARDBARI, A. M. et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 108, p. 122-128, 2017.
- BHAGIRATH, A. Y. et al. Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1781-1811, 2019.
- 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**, v. 94, p. 68-71, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017. 6. Brasília: Anvisa; 2017a. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+Seguran%C3%A7a+do+Paciente+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n+17/c0d5caa9-45b9-4861-b07b-b82b40b3334f>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Lei nº 9431, de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um Programa de Controle de Infecções Hospitalares e criarem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) para execução desse controle. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de janeiro de 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19431.htm>. Acesso em: 05 de novembro de 2019.

BOUCHER, H. W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n.1, p. 1–12, 2009.

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

CHEN, L. et al. Comparison of clinical manifestations and antibiotic resistances among three genospecies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **PLoS One**, v.13, n.2, p. 1-11, 2018.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

COSGAYA, C. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 4105–4111, 2016.

CUSTOVIC, A. et al. Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter Baumannii*. **Medical Archives**, v. 68, n. 6, p. 402-406, 2014.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 5, n. 12, p. 939–951, 2007.

DOUGHARI, H. J. et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2011.

DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–517, 2009.

DUARTE, A. et al. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 29-33, 2016.

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

ELHOSSEINY, N. M.; AHMED, A. S. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secreto-me. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, p. 33-38, 2018.

EZE, E. Z.; CHENIA, H. Y.; ZOWALATY, M. E. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2277–2299.

FALAH, F.; SHOKOOHIZADEH, L.; ADABI, M. Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. **Scars, Burns & Healing**, v. 5, p. 1–7, 2019.

FALLAH, A. et al. Frequency of *bap* and *cpaA* virulence genes in drug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their role in biofilm formation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 8, p. 849-855, 2017.

GRAMATNIECE, A. et al. Control of *Acinetobacter baumannii* outbreak in the neonatal intensive care unit in Latvia: whole-genome sequencing powered investigation and closure of the Ward. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 84, p. 1-8, 2019.

GOH, H. M. et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm associated protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 21, p. 6535-43, 2013.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2016.

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**, v. 59, n. 8, 2015.

HEIDARI, H. et al. Molecular analysis of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by ERIC-PCR. **Meta Gene**, v. 17, p. 132-135, Set 2018.

IMPERI, F. et al. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. **IUBMB Life**, v. 63, n.12, p. 1068–1074, 2011.

JÁCOME, P. R. L. A. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *P. aeruginosa* procedentes de hospitais públicos de Recife-PE. 99 f. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

KOBS, V. C. et al. The role of the genetic elements *bla_{oxa}* and *ISAb₁* in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 433-440, 2016.

KONEMAN, E.W.; WINN JR., W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido, 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1565p.

KRÖGER, C. et al. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 1-19, 2017.

LANNAN, M. F. M. et al. Evaluation of virulence gene expression patterns in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time polymerase chain reaction array. **Military medicine**, v. 181, n. 9, p. 1108-1113, 2016.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 25, p. 1-35, 2017.

LI, X. M. et al. Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 46, n. 3, p. 270-278, 2016.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n 12, p 787-814, 2014.

LIU, H. et al. Biofilm-Related Genes: Analyses in Multi- Antibiotic Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates From Mainland China. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1801-1807, 2016.

LIU, M. L. et al. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 4, p. 275-281, 2014.

LOEHFELM, T. W.; LUKE, N. R.; CAMPAGNARI, A. A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1036-44, 2008.

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

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**, v.18, n.3, p.268-281, 2012.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 23, n.1, p. 56–62, 2013.

MERMEL, L. A. What is the evidence for intraluminal colonization of hemodialysis catheters? **Kidney International**, V. 86, p. 28–33, 2014.

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

MORRIS, F. C. et al. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 1601-1621, 2019.

MUNIER, A. L. et al. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79 p. 179–184, 2019.

NEMEC, A. Classification and nomenclature of species in the genus *Acinetobacter*. Disponível em < <http://apps.szu.cz/anemec/anemec.htm>>. Atualizado em 27 de janeiro de 2020. Acesso em 03 de fevereiro de 2020.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 934–942, 2015.

NEVES, F. C. et al. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556–563, 2016.

PADOVEZE, M. C.; CASTELO BRANCO FORTALEZA, C. M. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PAKHARUKOVA, N. et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.115, n. 21, p. 5558–5563, 2018.

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

PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016.

QI, L., et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.483, p. 1-10, 2016.

RAIBLE, K. M. et al. Molecular characterization of β -lactamase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 75, p. 1-10, 2017.

REENA, A. A. A.; SUBRAMANIYAN, A; KANUNGO, R. Biofilm formation as a virulence factor of *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogen in critical care units. **Journal of Current Research in Scientific Medicine**, v. 3, n. 2p. 74-8, 2017.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p. 276-278, 2008.

RYU, S. Y; BAEK, W. K.; KIM. et al. Association of biofilm production with colonization among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 32, n. 2, p. 345-351, 2017.

RUMBO-FEAL, S., et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. **PLoS One**. v.8, n.8, p. 1-19, 2013.

RUSSO, T. A. et al. The response regulator BfmR is a potential drug target for *Acinetobacter baumannii*. **mSphere**, v. 1, n. 3, p. 1-19, 2016.

SAIPRIYA, K. et al. Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 15-27, 2020.

SANCHEZ, J. C. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 47, p. 1-12, 2013.

SCHROEDER, M.; BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. **Genes**, v. 8, n. 39, p. 1-23, 2017.

SCARCELLA, A. C. A.; SCARCELLA, A. S. A.; BERETTA, A. L. R. Z. Infecção relacionada à assistência à saúde associada a *Acinetobacter baumannii*: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 18-21, 2017.

SHIN, B; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 837–849, 2017.

SINGH, J. K.; ADAMS, F. G.; BROWN, M. H. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3301-3309, 2019.

SILVA, G. J.; DOMINGUES, S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 6, n. 28, p. 1-11, 2017.

SIQUEIRA, C. C. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of microorganisms in a university hospital from Vitória (ES), Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 2, p. 76-82, 2018.

SIVARANJANI, M. et al. Inhibitory effect of α -mangostin on *Acinetobacter baumannii* biofilms – an in vitro study. **Biofouling**, v. 34, n. 5, p. 579-593, 2018.

SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 315-333, 2019.

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

SOARES, S. G. S. C. et al. Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 6, n. 2, p. 37-43, 2017.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19; n. 11, p. 38-47, 2017.

STEPANOVIC, Set al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SULTAN, A. M; SELIEM, W. A. Identifying risk factors for healthcare-associated infections caused by carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 18, n. 1, p. 75–80, 2018.

TAYABALI, A. F. et al. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. **PLoS One**, v.7, n. 5, p. 1-11, 2012.

THOM, K. A. et al. Factors leading to transmission risk of *Acinetobacter baumannii*. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 7, p. 633–639, 2017.

THUMMEEPAK, 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. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 8, p. 807-815, 2007.

VIEIRA, P. G.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2015.

VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I. B.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future Science AO**, v. 5, n. 6, FSO395, 2019.

ZARRILLI, R. *Acinetobacter baumannii* virulence determinants involved in biofilm growth and adherence to host epithelial cells. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 367–368, 2016.

ZEIGMANI, H. et al. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p. 629-638, 2019.

WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Department of Essential Medicines and Health Products. 2017. Número de referência da OMS: OMS / EMP / IAU / 2017.12

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on core components of infection prevention and control programmes at the national and acute health care facility level. 2016.

APÊNDICE A – TABELA DE RESULTADOS

Tabela 5 - Identificação de isolados de *Acinetobacter* spp. através das características clínicas, fenotípicas e molecular.

Isolado	Tipo da amostra	Setor do Hospital	Antimicrobianos Resistentes	Perfil de Resistência	Formação de Biofilme	Oxa-51-like +/-	Genes de virulência				
							epsA +/-	csuE +/-	bap +/-	ompA +/-	bfmS +/-
A01	Sangue	Em. Geral	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A02	Sec. Traqueal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	-	-	+	+	+	+
A08	Sec. Traqueal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	-	+	+	+	+
A09	Ponta de Cateter	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	+	+	+	+	+
A10	Sangue	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Forte	+	+	+	+	+	+
A11	Sec. Traqueal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	-	+	+	+	+
A14	Sangue	Em. Geral	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A15	Urina	Enf. Cardiológica	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL, POL B	XDR	Fraca	+	-	+	+	+	-

Isolado	Tipo da amostra	Setor do Hospital	Antimicrobianos Resistentes	Perfil de Resistência	Formação de Biofilme	Oxa-51-like +/-	Genes de virulência				
							epsA +/-	csuE +/-	bap +/-	ompA +/-	bfmS +/-
A16	Sec. Traqueal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A18	Swab retal	Enf. Cardiológica	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A19	Sangue	Em. Geral	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	+	+	+	+	+
A20	Sangue	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A22	Swab retal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Forte	+	-	+	+	+	+
A24	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	-	+	+	+	+
A25	Sec. Traqueal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL, POL B	XDR	Fraca	-	-	-	+	-	-
A35	Swab nasal	Enf. Cardiológica	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	-	-	-	+	-	-
A38	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+

Isolado	Tipo da amostra	Setor do Hospital	Antimicrobianos Resistentes	Perfil de Resistência	Formação de Biofilme	Oxa-51-like +/-	Genes de virulência				
							epsA +/-	csuE +/-	bap +/-	ompA +/-	bfmS +/-
A39	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Forte	+	+	+	+	+	+
A40	Swab retal	UCO	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	+	+	+	+	+
A42	Sangue	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	-	+	+	+	+
A43	Sec. Traqueal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	-	+	-	+	+	-
A44	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	+	+	+	+	+	+
A50	Swab retal	UCO	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	-
A51	Ponta de Cateter	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Forte	+	+	+	+	+	-
A55	Ponta de Cateter	UTI	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	-	+	+	+	+
A59	Sec. Traqueal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Forte	-	+	-	+	+	-

Isolado	Tipo da amostra	Setor do Hospital	Antimicrobianos Resistentes	Perfil de Resistência	Formação de Biofilme	Oxa-51-like +/-	Genes de virulência				
							epsA +/-	csuE +/-	bap +/-	ompA +/-	bfmS +/-
A71	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL, POL B	XDR	Moderada	+	-	+	+	+	+
A72	Sec. Traqueal	UTI	GEN, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL, POL B	XDR	Forte	+	+	+	+	+	+
A73	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	-	-	+	+	+	-
A74	Swab retal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A75	Ponta de Cateter	Em. Geral	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	-
A76	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL, POL B	XDR	Fraca	+	+	+	+	+	+
A79	Sec. Traqueal	UTI	GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A87	Swab retal	Em. Geral	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	+
A89	Swab retal	UCO	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Fraca	-	-	+	+	+	-

Isolado	Tipo da amostra	Setor do Hospital	Antimicrobianos Resistentes	Perfil de Resistência	Formação de Biofilme	Oxa-51-like +/-	Genes de virulência				
							<i>epsA</i> +/-	<i>csuE</i> +/-	<i>bap</i> +/-	<i>ompA</i> +/-	<i>bfmS</i> +/-
A90	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	-
A91	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	+	+	+	+	-
A93	Swab retal	UTI	AMI, GEN, IMP, MER, CIP, LVX, CPM, CAZ, CRO, PPT, TRI/SUL	MDR	Moderada	+	-	+	+	+	-

A01: cepa 01, A02: cepa 02, A08: cepa 08, A09: cepa 09, A10: cepa 10, A11: cepa 11, A14: cepa 14, A15: cepa 15, A16: cepa 16, A18: cepa 18, A19: cepa 19, A20: cepa 20, A22: cepa 22, A24: cepa 24, A25: cepa 25, A35: cepa 35, A38: cepa 38, A39: cepa 39, A40: cepa 40, A42: cepa 42, A43: cepa 43, A44: cepa 44, A50: cepa 50, A51: cepa 51, A55: cepa 55, A59: cepa 59, A71: cepa 71, A72: cepa 72, A73: cepa 73, A75: cepa 75, A76: cepa 76, A79: cepa 79, A87: cepa 87, A89: cepa 89, A90: cepa 90, A91: cepa 91, A93: cepa 93. UTI: Unidade de Terapia Intensiva; UCO: Unidade coronariana; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; CIP: ciprofloxacina; LVX: levofloxacina; CPM: cefepime; CAZ: ceftazidime; CRO: ceftriaxone; PPT: piperacilina/tazobactam; TRI/SUL: trimetoprima + sulfametoxazol; POL B: polimixina B. (+): presente; (-): ausente.

APÊNDICE B – FOTOS DE RESULTADOS

Géis de eletroforese dos produtos de PCR

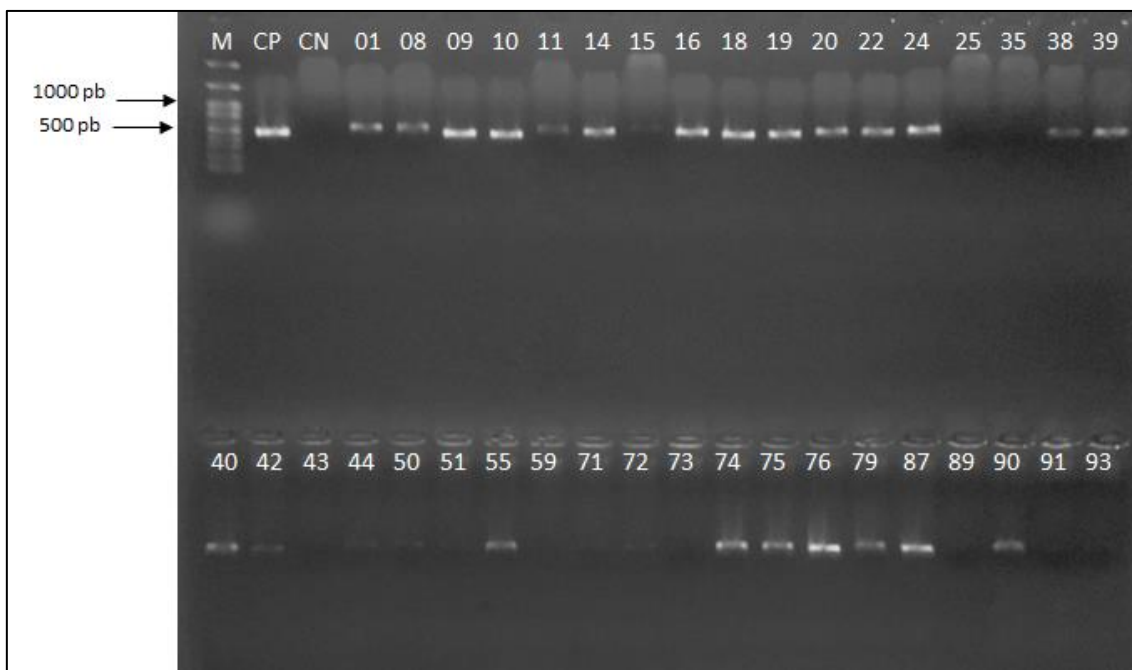


Figura 8 - Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-51-like} de 353 pb para identificação molecular da espécie *Acinetobacter baumannii*.

Legenda: M= marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), CP = controle positivo (cepa de *A. baumannii* 19606), CN = controle negativo, cepa 01, cepa 08, cepa 09, cepa 10, cepa 11, cepa 14, cepa 15, cepa 16, cepa 18, cepa 19, cepa 20, cepa 22, cepa 24, cepa 25, cepa 35, cepa 38, cepa 39, cepa 40, cepa 42, cepa 43, cepa 44, cepa 50, cepa 51, cepa 55, cepa 59, cepa 71, cepa 72, cepa 73, cepa 75, cepa 76, cepa 79, cepa 87, cepa 89, cepa 90, cepa 91, cepa 93.

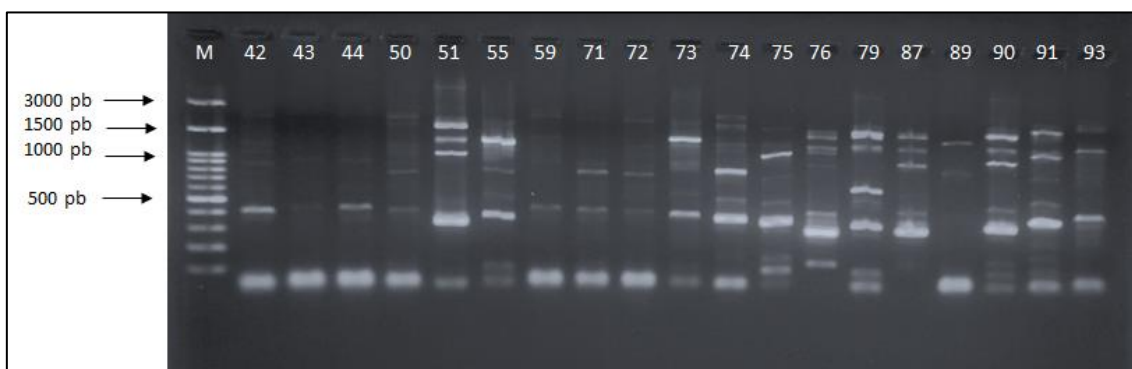


Figura 9 - Produtos de PCR da técnica ERI-PCR a partir do DNA total de cepas de *Acinetobacter* spp.

Legenda: M= marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), cepa 42, cepa 43, cepa 44, cepa 50, cepa 51, cepa 55, cepa 59, cepa 71, cepa 72, cepa 73, cepa 75, cepa 76, cepa 79, cepa 87, cepa 89, cepa 90, cepa 91, cepa 93.

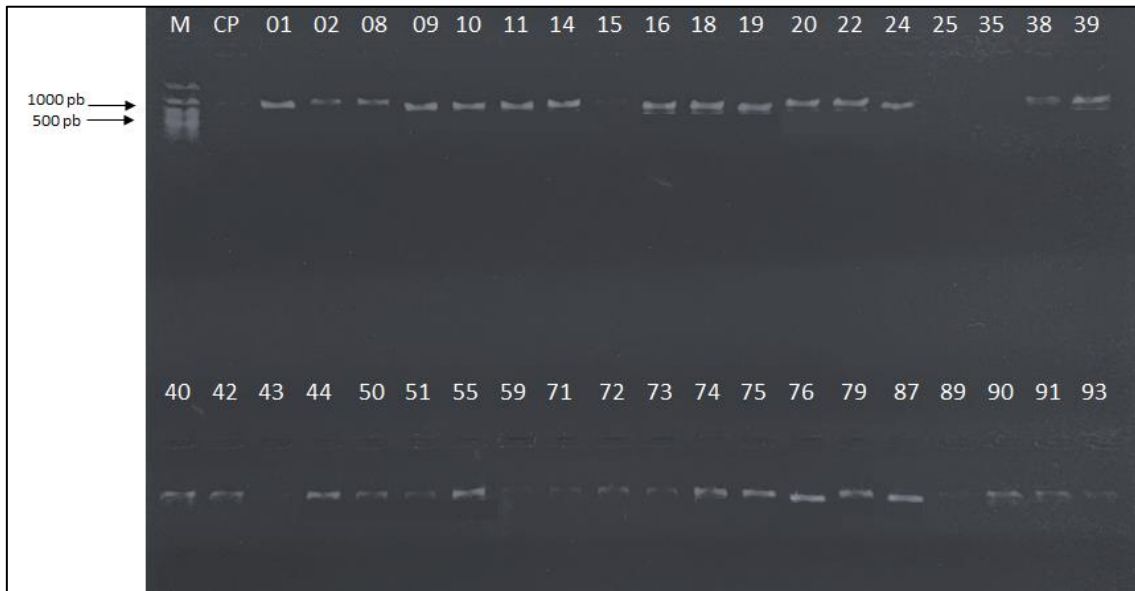


Figura 10 - Produtos de PCR do gene *ompA* de 531 pb a partir do DNA total de cepas de *Acinetobacter* spp., temperatura de pareamento 55°C.

Legenda: M= marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), CP = controle positivo (cepa de *A. baumannii* 19606), cepa 01, cepa 02, cepa 08, cepa 09, cepa 10, cepa 11, cepa 14, cepa 15, cepa 16, cepa 18, cepa 19, cepa 20, cepa 22, cepa 24, cepa 25, cepa 35, cepa 38, cepa 39, cepa 40, cepa 42, cepa 43, cepa 44, cepa 50, cepa 51, cepa 55, cepa 59, cepa 71, cepa 72, cepa 73, cepa 75, cepa 76, cepa 79, cepa 87, cepa 89, cepa 90, cepa 91, cepa 93.

ANEXO A - INSTRUÇÕES AOS AUTORES DA REVISTA BRASILEIRA DE TERAPIA INTENSIVA

Scope and Policy

Revista Brasileira de Terapia Intensiva (RBTI), ISSN 0103-507X, is the scientific journal of the Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) and Sociedade Portuguesa de Cuidados Intensivos quarterly issued scientific journal. It aims to publish relevant research involving acutely ill patients health care improvement, providing discussion, distribution and promotion of evidence-based information to intensive care professionals. It publishes research, review, comments, case report articles and letters to the Editor, involving all areas of knowledge related to intensive care of the critically ill patient.

RBTI endorses the recommendations from International Committee of Medical Journal Editors - Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, updated in April 2010, available in http://www.icmje.org/urm_main.html.

Any contribution submitted to RBTI must be original and the manuscript, or parts of it, must not be under consideration by any other journal. Also, authors should not submit the same manuscript in different languages to different journals. Authors should declare any potentially overlapping publications on submission for editor assessment and evaluation. We submit manuscripts to plagiarism detection tools in order to detect any duplication, overlapping publication or misconduct, and whenever any of these situations is detected, the Editor should contact the authors and its institution. If editor detects such situation, authors should expect prompt rejection of the submitted manuscript. If the editor was not aware of the situation previously to acceptance of the manuscript, then it will be retracted in a further edition of the Journal.

Submission process

The manuscripts can be submitted either in English, Portuguese or Spanish. RBTI is published in a Portuguese printed version and a Portuguese and English electronic version.

No fee for evaluation or publication of the manuscripts will be charged to the authors.

The journal will translate the articles submitted in Portuguese (or Spanish) and the translation costs will be covered by the journal. Articles submitted in English will be translated by the journal into Portuguese, with no expenses to the authors. All articles must be electronically submitted at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbti-scielo>

Authors should submit to the journal:

Cover letter - It should contain a declaration stating that the article is original, has not been or is not being submitted for publication in another journal. Authors should also state that the study was approved by the Research Ethics Committee (REC) of the institution where the study was conducted (or a reference REC), mentioning the number of registration and, if appropriate, a

statement that informed consent was obtained or exempted by the REC. If required, during the peer review process, authors might be asked to send a copy of REC approval.

Declaration of Conflict of Interest- Authors should download the appropriate form, (available from: http://www.rbti.org.br/imagebank/pdf/Disclosure_of_Potential_Conflits.pdf) and, after signature of the authors, upload it during the submission process. This declaration, according to resolution of the Federal Medical Council No. 1595/2000, prohibits scientific paper to promote or advertise any commercial products or equipment.

Funding - Information of possible sources of funding for research will be required during the submission process as well as in the title page of the manuscript.

Copyright transfer and publication authorization -After acceptance, a authorization signed by all authors to publish and a copyright transfer to the journal should be sent to Journal office (available from: http://www.rbti.org.br/imagebank/pdf/authors_responsability_and_copyright_transfer.pdf).

Patient's information - For all manuscripts that include information or clinical photographs in which patients can be individually identified, a writing consent signed by each patient or his family should be sent.

Peer review process

All manuscripts submitted to RBTI are subject to rigorous review. The initial submissions are reviewed by internal staff to ensure adherence to *RBTI* policies, including ethical requirements for human and animal experimentation. After this initial evaluation, the article can be send back to the authors for adequacy. Afterwards, the submitted manuscripts will be evaluated checked by the Editor. Manuscripts without merit, bearing significant methodology errors, or not fitting the journals editorial policy will be rejected, without a formal peer review process. Our average turn-around time for this immediate rejection is one week.

After the Editor-in-chiefs (or a designated editor) approval, the articles will be forwarded to two or more reviewers. They will always be from institutions different from the one the manuscript is from, being the anonymous condition kept during the entire editorial process. Our average turn-around time for the first answer to the authors is 30 days although a longer time might be required. After evaluation, the editors will choose between the following decisions: accept, minor revision, major revision, rejected and resubmit or reject. RBTI's acceptance rate is approximately 30%. In the past 12 months, the median time from submission to first decision for all articles was 28 days. After receiving the reviewers opinion, the authors should submit the revised version within 60 days including the suggested changes together with a point-to-point answer to each reviewer. Authors may contact RBTI (rbti.artigos@amib.org.br) if they require an extension. If not submitted within 6 months, the manuscript will be removed from the data base and an eventual resubmission will follow the initial submissions track. Upon resubmission, the editors may choose to send the manuscript back to external reviewers, or may render a decision based on personal expertise.

The opinions expressed in the articles, including reviewer-requested changes, will be the only authors responsibility.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national, if applicable) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. When reporting experiments on animals, authors should be asked to indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed. In any either clinical or experimental, human or animal studies these information should be placed in the section Methods. Revista Brasileira de Terapia Intensiva ethical statements can be found in our website (<http://www.rbti.org.br/eticas.asp>).

Authorship criteria

Only person who directly contributed to the articles intellectual contents should be considered authors, according to the criteria below:

1. Created the initial idea and planned the study or interpreted the final results OR
2. Wrote the manuscript or revised its successive versions AND
3. Approved the final version.

Administrative positions and data collection are not considered criteria for authorship and, when appropriate, should be included in the Acknowledgements session.

Manuscripts preparation

All articles should include:

Title page:

Full title of the article All authors full names Each author institutional affiliation (only the main affiliation, i.e. affiliation to the institution where the work was developed) Author for correspondences complete address (including phone and fax numbers and email). The Institution to be considered as responsible for sending the article.

The projects funding source. Running title - An alternative title for the article, containing up to 60 characters with spaces. This title should be displayed in all articles sheet headings. Cover title - When the articles title has more than 100 characters with spaces, an alternative title should be provided, including up to 100 characters (with spaces) to be displayed in the journals cover.

Abstracts

Portuguese abstract: The Portuguese abstract should have up to 250 words. Abbreviations should be avoided as far as possible. It should be structured with the same chapters as the main text (Objective, Methods, Results and Conclusion), and accurately reflect the main text contents. In reviews and case reports, the abstract should not be structured. Comments should have abstracts shorter than 100 words. The Portuguese abstract has only to be provided for manuscripts submitted in this language.

English Abstract: The English abstract has only to be provided for manuscripts submitted in this language. Manuscripts submitted in Portuguese will have their Abstract translated into English by the journal.

Keywords

Six Portuguese and English terms should be provided defining the papers subject. These should be based on the National Library of Medicines MeSH (Medical Subject Headings), available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>.

Text

The articles should be submitted in MS Word® file with Times New Roman 12 font, double space, including for tables, legends and references. In all article categories the references should be numerical, superscripted, and sequential.

Original articles

These are articles presenting investigational results. The text should have up to 3,500 words, excluding the title sheet, abstract, tables and references. Articles larger than this should be approved by the Editor. The maximal recommended number of authors is eight. If more authors have to be included, this should be justified, explaining each authors participation. Original articles should have:

Introduction - This section should be written as a non-expert stand point, and clearly provide - and if possible, illustrate - the rational for the research and its objectives. Clinical trial reports should, whenever appropriate, include a literature research abstract, indicating why the study was needed and the aimed study contribution. This section should end with a short statement on the article reported subject.

Methods - This should include the study design, the scenario, type of participants or materials, a clear description of interventions and comparisons, type of analysis used and their statistical power, if appropriate.

Results - The results should be presented in clear and logical sequence. The statistical analysis results should include, when appropriate, the relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals.

Discussion - All results should be discussed and compared to the relevant literature.

Conclusion - This section should clearly discuss the main research conclusions and provide clear explanation on its relevance.

References - References should be sequential, according to the order of quotation on text, and limited to 40 references. See below the reference rules.

Review articles

A review article is a comprehensive description of certain health care aspects relevant to the journal scope. Should have no more than 4,000 words (excluding the title sheet, abstract, tables and references) and up to 50 references. They should be written by acknowledgeable experienced authors, and the authors number should not exceed three, except justification to be submitted to the journal. The reviews may be systematic or narrative. In reviews it is also recommended having a "Methods" section, reporting the evidence sources and the key words used for the literature search. Systematic literature reviews containing appropriate search strategies and results are considered original articles.

Case reports

This section is devoted to publish rare medical reports, describing their aspects, history and management. They should include a non-structured abstract, a brief introduction and literature review, the case description and a short discussion. Case reports should have up to 2,000 words, with five authors and 10 references.

Comments

These are expert-written opinion articles, to be read by the general medical community. Usually the authors are invited by one of the editors, however unsolicited articles are also welcome, and routinely evaluated for publication. The comment objective should be highlighting an issue,

expanding the highlighted subject, and suggesting the sequence. Any statement should be referenced, however it is preferable that the reference list is limited to 15. For readability, the sentences should be short and objective. Use subtitles for dividing the comments section. This should be short, up to 800 to 1,000 words, except the abstract and references. The number of authors should not exceed two, unless justified.

Letters to the editor

RBTI publish comments to any article published in the journal and an authors or editors response is generally pertinent. Rebutter is not allowed. These should have up to 500 words and up to 5 references. The subject RBTIs article should be mention in the text and references. The authors should also submit their complete identification and address (including phone number and e-mail). All letters are edited and sent back to the authors before publication.

Guidelines

The journal regularly publishes guidelines and recommendations drawn up by both the Brazilian Association of Intensive Care Medicine (AMIB) and the Portuguese Society of Intensive Care (SPCI).

Acknowledgements

The authors should use this section to acknowledge eventual research funding and academic organisms support; foment agencies; colleagues and other collaborators. The authors should grant permission from all mentioned in the acknowledgments section. This should be concise, not exceeding 4 lines.

References

References should be updated, preferably containing the most relevant articles published on the subject in the last five years. They should not contain articles not quoted in text or unpublished works. The references should be consecutively numbered in the text quotation sequence, and identified with Arabic numerals. The display should comply with the Vancouver Style format, as in the models below. The journal titles should be abbreviated according to the National Library of Medicine, available at the List of Journal Indexed in Index Medicus, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>.

For all references, mention up to six authors. In case of more than six authors, mention the first six authors followed by the expression et al.

Printed articles

Dellinger RP, Vincent JL, Silva E, Townsend S, Bion J, Levy MM. Surviving sepsis in developing countries. Crit Care Med. 2008;36(8):2487-8.

Levy MM, Vincent JL, Jaeschke R, Parker MM, Rivers E, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: Guideline Clarification. Crit Care Med. 2008;36(8):2490-1.

Electronic articles

Buerke M, Prondzinsky R. Levosimendan in cardiogenic shock: better than enoximone! Crit Care Med [Internet]. 2008 [cited 2008 Aug 23];36(8):2450-1. Available from: <http://www.ccmjournal.com/pt/re/ccm/abstract.00003246-200808000-00038.htm>

Hecksher CA, Lacerda HR, Maciel MA. Características e evolução dos pacientes tratados com drotrecogina alfa e outras intervenções da campanha "Sobrevivendo à Sepse" na prática clínica.

Rev Bras Ter Intensiva [Internet]. 2008[citado 2008 Ago 23; 20(2): 135-43. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/rbti/v20n2/04.pdf>

Supplements

Walker LK. Use of extracorporeal membrane oxygenation for preoperative stabilization of congenital diaphragmatic hernia. Crit Care Med. 1993;21 (Supp. 1): S379-S380.

Books

Doyle AC. Biological mysteries solved. 2nd ed. London: Science Press; 1991.

Book chapters

Lachmann B, van Daal GJ. Adult respiratory distress syndrome: animal models. In: Robertson B, van Golde LM. Pulmonary surfactant. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 635-66.

Published abstracts

Varvinski AM, Findlay GP. Immediate complications of central venous cannulation in ICU [abstract]. Crit Care. 2000;4(Suppl 1):P6.

In press articles

Giannini A. Visiting policies and family presence in ICU: a matter for legislation? Intensive Care Med. In press 2012.

Tables and figures

All figures and tables should be numbered according to the order mentioned in the text. Tables and figures should be inserted below the text, following references, only one in each page, the later preferably prepared as MS Excel®, TIF, or JPG with **300 DPI** files. Figures needing increased resolution should be submitted in files apart. Figures containing texts should be provided in open files, for translation. If not possible, the author should provide the translation. The quantities, units and symbols used should adhere to national rules. The figures should have legends explaining the results, allowing understanding without consulting the text. The tables and figures legends should be concise but self-explaining, allowing understanding without consulting the text. The units should be inside the table and statistical tests indicated in the legend.

Surgery and biopsy pictures with special staining techniques will be considered for color printing, being the additional costs the authors responsibility. Figures already published should be accompanied by the author/editor authorization.

Reproduced figures, charts, plots or tables, not originally belonging to the article, should reference the original source.

Abbreviations and initials

The use of abbreviations should be avoided in the articles title, abstract and tables and figures headings. Their use should be minimized in the entire text. They should be preceded by the entire name when first mentioned in the text. The abbreviations, symbols and other signs meanings should be provided in the figures and tables foot notes.