



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE



MARIANA MOREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA E
PERFIL CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *A. baumannii* - *A.*
calcoaceticus OBTIDOS A PARTIR DE HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E
PRIVADA DE MACEIÓ-AL.**

Recife
2020

MARIANA MOREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA E
PERFIL CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *A. baumannii* - *A.*
calcoaceticus OBTIDOS A PARTIR DE HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E
PRIVADA DE MACEIÓ-AL.**

Recife

2020

MARIANA MOREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA E
PERFIL CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *A. baumannii* - *A.*
calcoaceticus OBTIDOS A PARTIR DE HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E
PRIVADA DE MACEIÓ-AL.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada à Saúde,
do Centro de Biociências da
Universidade Federal de
Pernambuco como requisito
parcial para obtenção do título
de mestre em Biologia Aplicada
a Saúde.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Prof^a Dra. Dyana Leal Veras

Recife

2020

MARIANA MOREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA E
PERFIL CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *A. baumannii* - *A.*
calcoaceticus OBTIDOS A PARTIR DE HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E
PRIVADA DE MACEIÓ-AL.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada à Saúde,
do Centro de Biociências da
Universidade Federal de
Pernambuco como requisito
parcial para obtenção do título
de mestre em Biologia Aplicada
a Saúde.

Aprovado em: 19/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Ana Paula Sampaio (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz (Examinador Externo)

Fiocruz - Instituto Aggeu Magalhães

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Alves, Mariana Moreira

Avaliação da ocorrência de genes de resistência e virulência clonal de isolados clínicos do complexo *A. baumannii*- *A. calcoaceticus* obtidos a partir de hospitais da rede pública e privada de Maceió-AL. / Mariana Moreira Alves – 2020.

92 f.: il., fig., tab.

Orientador: Luis Carlos Alves

Coorientadora: Dyana Leal Veras

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2020.

Inclui referências.

1. Multirresistência bacteriana 2. Infecção hospitalar 3. Genes de virulência
I. Alves, Luis Carlos (orient.) II. Veras, Dyana Leal (coorient.) III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 081

Dedico a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Wilker Melo por me acompanhar durante toda minha jornada, pelo seu carinho e cumplicidade em todos os momentos e por não soltar da minha mão mesmo nas horas mais difíceis;

À Flávinha Machulis, pelas risadas, pelos ensinamentos, pelas horas boas e ruins que passamos, por todas as dificuldades superadas e principalmente pela amizade que construímos;

À minha mãe pelo apoio, por acreditar na minha capacidade mesmo quando eu mesma pensava ser incapaz e por me ensinar a não desistir dos meus sonhos;

Ao meu pai, pelo incentivo, por me ensinar a lutar pelos meus objetivos e por estar ao meu lado em todos os momentos;

À minha avó Jadviga pelo apoio, por sempre me incentivar a continuar estudando;

À minha família por sempre estarem ao meu lado mesmo durante meus longos períodos de ausência;

Aos meus orientadores Luiz e Fábio, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo incentivo;

Aos meus amigos Diogo, Sylvinha, Victor, Ana Cristina, Jô, Gisella que sempre me apoiaram que mesmo distantes continuam ao meu lado me dando forças para seguir em frente;

Aos amigos que conquistei em Recife Ketheleen, Aline e Thiago, pelas conversas, por me mostrarem novas visões de mundo e principalmente por tornarem minha vida mais alegre;

Aos amigos do LBCM Ana Paula, Dyana, Catarina, Jana, Janderson e Gilsan, pelos incontáveis momentos de ajuda, pelos ensinamentos, pela paciência pelas conversas e por me mostrarem o caminho a seguir todas as vezes em que senti perda;

Aos demais colegas de laboratório pelo auxílio e pelos ensinamentos;

À Jesus e Geone, pela ajuda, dedicação e paciência, pela coleta e armazenamento das amostras, sem vocês este trabalho não teria sido possível;

Ao pessoal da esterilização por tornarem nosso trabalho mais fácil;

Aos funcionários do LIKA pela atenção e sempre estarem dispostos a ajudar;

Às funcionárias da recepção pela paciência e compreensão e por sempre estarem dispostas a nos auxiliar;

Aos professores da pós – graduação pelos ensinamentos compartilhados;

À todos os profissionais do LIKA e Aggeu Magalhães que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“Talvez sejamos somente bactérias em um enorme corpo chamado Universo.”

MIRANDA, M. M.

RESUMO

O complexo *A. baumannii* – *A. calcoaceticus* (complexo ABC), é composto por cinco espécies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. dijkshoorniae* sendo responsável por 80% dos casos de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde envolvendo *Acinetobacter* sp.. A resistência a carbapenêmicos em do complexo ABC é descrita em todo o mundo sendo indicada como preocupante pela Organização Mundial de Saúde devido à limitação terapêutica para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. O fenótipo multidrogas resistente – MDR, aliado ao surgimento de isolados hipervirulentos, tem aumentado a gravidade das infecções. A resistência a carbapenêmicos se dá principalmente pela ocorrência de genes *bla*_{OXA}, entretanto a aquisição de plasmídios codificadores das enzimas VIM, KPC, IMP, NDM e GES têm sido descritas em diversas localidades e a coexistência destas enzimas contribui para a ampliação do espectro de resistência bacteriana. Neste trabalho, isolados pertencentes ao complexo ABC foram coletados em dois hospitais públicos e um privado de Maceió/AL, entre maio e dezembro de 2018, todos com perfil MDR identificado pelos hospitais. Foram pesquisadas as ocorrências dos genes *bla*_{OXA51LIKE}, *bla*_{OXA23LIKE}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *ompA*, *entA*, *bfmS*, *csuE*, e *pilM* e a ocorrência de mutações no gene *pmrB* em isolados resistentes a Polimixinas. Foram coletados 40 isolados pertencentes ao complexo ABC identificados através de espectrometria de massa MALDI-TOF MS. 82,5% dos isolados abrigavam *bla*_{OXA51}, indicativo da espécie *Acinetobacter baumannii*. O perfil clonal obtido através de ERIC-PCR indicou a presença de nove *clusters* predominantemente formados por cepas do mesmo hospital, não indicando transmissão inter-hospitalar. Os seis clones encontrados apresentaram a ocorrência de apenas dois isolados, com intervalo médio de ocorrência de 3,16 meses, não indicando surtos. Todos os genes de virulência pesquisados apresentaram maior ocorrência em amostras coletadas de pacientes de UTIs. Dos isolados com informações disponibilizadas pelos hospitais, todos apresentaram resistência aos carbapenêmicos Meropenem, Ertapenem e Imipenem, sendo que 76,92% apresentaram o fenótipo de resistência extensiva (XDR). Dos isolados XDR, 40% foram resistentes às Polimixinas. Análise das mutações em *pmrB* não apresentaram alterações na proteína, entretanto 64,28% apresentaram duas mutações quando alinhados a sequência referência da ATCC 19606, tendo 100% de identidade entre

si. A distribuição destes isolados nos *clusters* sugere que este perfil possa ser característico da região. Em nosso estudo, 80,48% dos isolados amplificaram *bla*_{oxa23}, tiveram ocorrência igual a 80% entre os isolados de *A. baumannii* e espécies não *baumannii*. As enzimas IMP e NDM não foram encontradas, entretanto os genes *bla*_{GES} e *bla*_{VIM} foram encontrados pela primeira vez no Brasil em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., tendo a ocorrência da carbapenemase GES de 70% com distribuição em todos os *clusters*, indicando que o gene é comum na região. A metalo-β-lactamase VIM foi abrigada em 5% dos isolados que abrigavam também GES, KPC OXA-23 e OXA-51. Desta forma, observa-se que os isolados clínicos do complexo ABC de incidência em Maceió/AL apresentam um alto perfil de resistência aos antimicrobianos, abrigando os genes *bla*_{GES} e *bla*_{VIM}, sendo aqui descritos pela primeira vez em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no Brasil.

Palavras-Chave: Multiresistência bacteriana. Genes de resistência. Genes de virulência.

ABSTRACT

A. baumannii - *A. calcoaceticus* (ABC complex) complex is composed of five species: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* *A. dijkshoorniae* being responsible for 80% of the cases of Health care-related infections involving *Acinetobacter* sp.. The resistance to carbapenems in ABC complex is described worldwide and has been identified as a cause for concern by the World Health Organization due to the therapeutic limitation in the treatment of infections caused by these microorganisms. Multidrug-resistant-MDR phenotype combined with the appearance of hypervirulent isolates increased the pathogenicity and severity of infections, especially in isolates resistant to polymyxins. Resistance to carbapenems is mainly due to the occurrence of *bla*_{OXA} genes, however, the acquisition of plasmids encoding the enzymes VIM, KPC, IMP, NDM and GES has been described in several places and the coexistence of these enzymes contributes to the expansion of the spectrum of bacterial resistance. In this work, isolates of the ABC complex were collected in 2 public and 1 private hospital in Maceió/AL, between May and December 2018, all with MDR profile identified by the hospitals. Occurrences of the *bla*_{OXA51LIKE}, *bla*_{OXA23LIKE}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *ompA*, *entA*, *bfmS*, *csuE*, and *piIM* genes and the occurrence of mutations in the *pmrB* gene in isolates resistant to Polymyxins were investigated. Forty isolates belonging to the ABC complex were identified by MALDI-TOF/MS. 82.5% of the isolates harbored *bla*_{OXA51} indicative of the species *Acinetobacter baumannii*. Clonal profile obtained by ERIC-PCR indicated the presence of 8 groups predominantly formed by strains from the same hospital, not indicating inter-hospital transmission. Eight clones were formed by only 2 isolates with an average occurrence interval of 3.16 months, not indicating outbreaks. All virulence genes surveyed had a higher occurrence in samples collected from ICU patients. Isolates with information provided by hospitals 26/40, all showed resistance to the carbapenems Meropenem, Ertapenem and Imipenem, with 76.92% showing the extensive resistance phenotype (XDR). XDR isolates, 40% were resistant to Polymyxins. Analysis of mutations in *pmrB* showed no changes in protein, however, 64.28% showed 7 mutations when aligned with the reference sequence of ATCC 17978, having 100% identity with each other, the distribution since isolates in the clusters. In our study, 80.48% of the isolates (33/40) amplified *bla*_{OXA23}, with an occurrence equal to 80% among the isolates of *A. baumannii* and non-*baumannii* species (28/35 and 4/5 respectively). Enzymes IMP and NDM were not found,

however, the *bla*_{GES} and *bla*_{VIM} genes, were found for the first time in Brazil in clinical isolates of *Acinetobacter* spp., with the occurrence of 70% carbapenemase GES with distribution in all clusters indicating that the gene is common to the region. Metallo-beta-lactamase VIM was housed in 5% of the isolates that also housed the carbapenemases GES, KPC OXA-23 and OXA-51. Thus, it is observed that clinical isolates of the ABC complex of incidence in Maceió/AL have a high profile of resistance to antimicrobials harboring the *bla*_{GES} and *bla*_{VIM} genes, being described here for the first time in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Brazil.

Keywords: Bacterial multiresistance. Resistance genes. Virulence genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formação e estabilização do biofilme bacteriano.....	31
Figura 2 -	Estrutura de ligação do pilus arcaico com superfícies abióticas formado por <i>csuE</i>	34
Figura 3 -	Estrutura da pré-acinetobactina (1a) e acinetobactina (2a). (b) Mecanismo de isomerização da pré-acinetobactina oxazoline (1a) em acinetobactina isoxazolidnone (2a).....	37
Figura 4 -	Estrutura externa de bactérias gram-negativas indicando a membrana externa, camada de peptidoglicano e membrana interna apontando a localização das porinas.....	38
Figura 5 -	Estrutura química dos principais β -lactâmicos, apresentando a estrutura do anel β -lactâmico circulado por linhas tracejadas.....	41
Figura 6 -	Epidemiologia global de <i>Acinetobacter</i> spp. resistentes a Carbapenêmicos em 2014.....	45
Figura 7 -	Distribuição geográfica do gene <i>bla_{NDM}</i> em 2015.	46
Figura 8 -	Fórmula química da Polimixina B indicando local de substituição de D-Phe por D-leu originando a fórmula da Colistina.....	47
Figura 9 -	Estrutura do Lipídeo A.....	48
Figura 10 -	Mecanismo de ação da Polimixina B, apontando a interação do fármaco com o LPS e o deslocamento de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} provocando a desestabilização da LPS e rompimento da membrana.....	49
Figura 11 -	Perfil clonal obtido através da técnica de ERIC-PCR.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Espécies identificadas por MALDI TOF MS.....	60
Gráfico 2 -	Ocorrência dos genes de virulência.....	65
Gráfico 3 -	Ocorrência de <i>csuE</i> em isolados de <i>A. baumannii</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.....	65
Gráfico 4 -	Relação entre a ocorrência dos genes de virulência entre os setores hospitalares.....	66
Gráfico 5 -	Relação entre a coexistência de <i>csuE</i> e <i>bfmS</i> entre setores dos hospitais.....	67
Gráfico 6 -	Ocorrência de GES entre isolados MDR e XDR.....	71
Gráfico 7 -	Relação entre ocorrência de β -lactamases produzidas e fenótipo de resistência.....	71
Gráfico 8 -	Ocorrência de <i>csuE</i> entre os clones.....	72
Gráfico 9 -	Relação entre ocorrência de β -lactamases produzidas e fenótipo de resistência.....	73
Gráfico 10 -	Ocorrência de <i>csuE</i> entre os clones.....	74

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das β -lactamases de acordo com Ambler e Busch-Jacoby.....	42
Tabela 2 -	Relação dos antimicrobianos utilizados na obtenção do CIM, diluições utilizadas e valores de resistência e sensibilidade estabelecidos pelo CLSI.....	54
Tabela 3 -	<i>Primers</i> utilizados neste estudo e temperaturas de anelamento padronizadas para o uso.....	57
Tabela 4 -	Dados das amostras disponibilizados pelos hospitais.....	60
Tabela 5 -	CIMs obtidos para Meropenem, Polimixina B e Colistina.....	67
Tabela 6-	Ocorrência dos genes de Resistência e Virulência e distribuição dos isolados de acordo com a tipagem obtida por ERIC PCR.	70
Tabela 7 -	Perfil de resistência a carbapenêmicos dos clones.....	74
Tabela 8-	Análise das mutações em <i>pmrB</i> em isolados resistentes as Polimixinas.....	76

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μg	Micrograma
μL	Microlitro
A	Adenina
ABC	A. baumannii – A. calcoaceticus
AMC	Amoxicilina + ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de variáveis
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de microorganismos Norte americana
ATM	Aztreonam
Bap	Proteína Associada a Biofilme
BHI	Infusão de cérebro e coração
C	Citosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação Ética
CAZ	Ceftazidima
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CIM	Concentração Inibitória Mínima

CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
COL	Colistina
CPM	Cefepime
Da	Dalton
Dab	Ácido diaminobutílico
DHBA	Ácido 2,3-di-hidroxibenzóico
D-Leu	D-leucina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
D-Phe	D-fenilalanina
eDNA	DNA extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	Eosina Azul de Metileno
EPS	Proteínas extracelulares
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ERT	Ertapenem
EUCAST	Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
G	Guanina
g	Força centrífuga relativa
GEN	Gentamicina
GES	<i>Guiana extended-spectrum</i>
h	Hora
I	Intermediário
IMP	Imipenemase

IPM	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
IV	Quatro
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LCR	Líquido encéfalo raquidiano
LEV	Levofloxacina
LINNANO	Laboratório de Multiusuários de Nanotecnologia
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
M	Molar
m/ Δ m	Massa pela massa total
mA	Miliamper
MALDI TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MBLs	Metalo-beta-lactamases
MBT_FC.par	<i>MALDI Biotyper method - Linear and Positive mode, for fingerprint spectra</i>
MDR	Multidroga resistente
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPM	Meropenem
NC	Nucleotídeo
NDM	Nova Deli Metallo- β -lactamase

nm	Nanômetro
NOR	Norfloxacina
°C	Grau Celsius
Omp	Proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilinase
pb	Pares de base
PBP _s	Proteínas de ligação a penicilina
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
POL	Polimixina B
PPT	Piperacilina + tazobactam
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
S	Sensível
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIM	Seoul Imipenemase
STE	SDS Tris EDTA
Susc	Susceptibilidade
T	Timina
TBE	Tris ácido Bórico EDTA
TE	Tris ácido etilenodiamino tetra-acético
Temp.	Temperatura
TFA	Ácido tri flúor ascético

TU	Tjernberg e Ursing
UFC	Unidade Formadora de colônia
UPGMA	Método de grupo de pares não ponderados com média aritmética
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIM	Verona metalo- β -lactamase
β	Beta
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivo geral.....	25
1.1.2	Objetivos específicos.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	GÊNERO <i>ACINETOBACTER</i>	25
2.1.1	COMPLEXO <i>A. BAUMANNII</i> - <i>A. CALCOACETICUS</i> (COMPLEXO ABC)	27
2.2	MECANISMOS DE VIRULÊNCIA.....	29
2.2.1	Biofilme	30
2.2.2	Pili tipo IV	35
2.2.3	Sideróforos	36
2.2.4	Proteínas de membrana externa - Outer Membrane Proteins (Omps).....	37
2.3	TIPAGEM MOLECULAR	39
2.4	MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ..	40
2.4.1	Mecanismos de ação dos β -lactâmicos.....	40
2.4.2	Mecanismo de Resistência aos β -lactâmicos	42
2.4.3	Carbapenemases	43
2.4.4	Metalo- β -lactamases	45
2.4.5	Polimixinas.....	46
2.4.6	Mecanismos de ação das Polimixinas.....	48
2.4.7	Mecanismos de Resistência às Polimixinas	50
3	METODOLOGIA.....	51
3.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	51
3.2	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	52
3.3	REATIVAÇÃO E REIDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS .	52
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	53
3.4.1	Preparo das placas.....	53
3.4.2	Leitura das placas e determinação do CIM	54
3.5	CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	55

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	55
3.7 OBTENÇÃO DO PERFIL CLONAL.....	56
3.8 ANÁLISE DOS AMPLICONS	56
3.9 ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA.....	57
3.10 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES EM <i>PMRB</i>	58
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
4 RESULTADOS	59
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO ..	59
4.2 TIPAGEM MOLECULAR	62
4.3 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA	64
4.4 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE SETORES DOS HOSPITAIS.....	66
4.5 PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA.....	67
4.6 OCORRÊNCIA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	69
4.7 RELAÇÃO ENTRE PERFIL CLONAL E OCORRÊNCIA MOLECULAR DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA.....	73
4.8 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DECORRENTES DA RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS.....	75
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Em abril de 2014, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou o primeiro relatório alertando sobre a ocorrência de cepas bacterianas multidrogas resistentes (MDRs) em todo o mundo (WHO, 2014).

Apenas três anos depois da primeira ocorrência de bactérias MDR, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um alerta indicando uma lista de bactérias a ser priorizada para pesquisa de novos antimicrobianos, devido às suas altas resistências; desta forma, as espécies *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenêmicos, *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenêmicos, *Enterobacteriaceae*, resistentes a carbapenêmicos, e cefalosporinas de terceira geração são encontradas no ápice da lista, considerando crítica a necessidade de novos fármacos para o tratamento destas infecções (WHO, 2017).

Embora *Acinetobacter* spp. tenha sido considerada de pouca importância clínica até a década de 1970, atualmente é frequentemente identificada em casos de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) em todo o mundo, sendo responsável por inúmeros casos de meningites, septicemia, bacteremias e infecções urinárias, principalmente em pacientes internos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) com necessidades de ventilação mecânica e pacientes imunocomprometidos (PEREIRA, 2013; ALMASAUDI, 2018).

Apesar de *Acinetobacter* spp. ser considerado um patógeno de virulência limitada, a capacidade da bactéria de aderir e invadir células epiteliais, juntamente com sua capacidade de produção de sideróforos, que possibilitam que a bactéria adquira ferro mesmo em condições de pouca disponibilidade, são fatores que aumentam a morbidade e mortalidade em infecções causadas pelo microrganismo (GARNACH-MONTEIRO et al., 2016; ANSARI et al., 2018; SATO et al., 2017).

Um outro mecanismo que potencializa a disseminação desta espécie, além de auxiliar na virulência bacteriana, é a produção de biofilme, responsável pelo aumento da resistência a antimicrobianos apresentados, visto que organismos envoltos na estrutura polimérica podem apresentar aumento de 10 a 100 vezes na sua resistência quando comparados com células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001).

A alta incidência de *A. baumannii* em UTIs pode ser associada à sua capacidade de permanecer em ambientes secos com pouca disponibilidade de nutrientes, potencializada pela formação de biofilme. O biofilme é um dos fatores de virulência mais importantes para a sobrevivência do microrganismo no ambiente e é responsável pela fixação do microrganismo em dispositivos médicos tais como cateteres, válvulas cardíacas, ventiladores mecânicos, entre outros, possibilitando a disseminação bacteriana e vinculando a inúmeros casos de IRAS (VUOTTO; DONELLI, 2019; LONGO, VUOTTO; DONELLI, 2014; MAH; O'TOOLE, 2001; HARDING et al., 2013; LEITE, 2016; KRZYŚCIAK et al., 2017).

O fenótipo MDR apresentado por *A. baumannii* tornou-se um problema de saúde mundial devido à alta disseminação de plasmídeos carreadores de genes de resistência e à presença de genes cromossômicos codificadores de enzimas que degradam os antimicrobianos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; CHEN et al., 2019; CHAGAS, 2015; EL-HAFA et al., 2019; AL-AGAMY et al., 2017).

Os carbapenêmicos são antimicrobianos de alto espectro com baixa toxicidade e alta especificidade, por este motivo são os fármacos mais indicados para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. MDR (KONEMAN, 2018).

Atualmente estima-se que a ocorrência mundial de isolados *A. baumannii* MDRs seja aproximadamente 45%, sendo esta taxa aumentada para 70-87% em países da América Latina, África e Ásia, 87-93% em países da Europa e Oriente Médio (CLARK, ZHANEL, LYNCH, 2016; HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018; CHEN et al., 2019).

No Brasil, em 2015, a ocorrência de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos era de 77,4% dos isolados clínicos, fato que limita as opções de antimicrobianos eficazes no tratamento e aumenta a taxa de insucesso terapêutico (ANVISA, 2017; HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018; CHEN et al., 2019).

Devido à carência de dados relativos à ocorrência de *Acinetobacter* spp. multidroga-resistente e seu perfil molecular em Maceió-AL e a rápida disseminação de genes de virulência e resistência a antimicrobianos em isolados de bactérias Gram-negativas no mundo, este trabalho buscou elaborar o perfil molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. obtidos em hospitais da rede pública e privada da capital Alagoana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência e clonalidade de *Acinetobacter* spp. carreadores de genes de resistência e virulência provenientes de isolados clínicos obtidos a partir de hospitais da rede pública e privada de Maceio-AL.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar os isolados de *A. baumannii* e *Acinetobacter* spp.;
- Avaliar aspectos epidemiológicos do complexo ABC em isolados clínicos de hospitais de Maceió-AL;
- Identificar o perfil fenotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos;
- Traçar o perfil clonal dos isolados clínicos do *Complexo A. baumannii* - *A. calcoaceticus*.
- Verificar a ocorrência dos genes de virulência: *ompA*, *pilM*, *entA*, *csuE* e *bfmS*;
- Identificar a ocorrência dos genes de resistência: *bla*_{OXA-51 like}, *bla*_{OXA 23 like}, *bla*_{KPC} e *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} e *bla*_{VIM};
- Verificar mutações no gene de formação de LPS *pmrB* ligado à resistência a Polimixinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO ACINETOBACTER

Acinetobacter spp. foi isolada pela primeira vez em 1911 pelo microbiologista holandês Beijerinck, que descreveu o microrganismo e o nomeou de *Micrococcus calcoaceticus*. Entretanto, em 1954, os pesquisadores Brisou e Prévot propuseram a criação do gênero *Acinetobacter*, derivado da palavra grega “akinetos” que significa imóvel, para separar microrganismos sem motilidade dos com motilidade pertencentes ao gênero *Achromobacter*; contudo esta divisão só foi reconhecida no

ano de 1980 (SHERMAN, McGOWAN, SNEATH, 1980; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

Acinetobacter spp. é um gênero de bactérias formado por cocobacilos gram-negativos, arranjos em diplococos ou em cadeias curtas, aeróbicos, não fermentadores, sem motilidade, catalase positivas e oxidase negativas; no DNA bacteriano é encontrada uma porcentagem de G + C, variando entre 39 e 47% do total de bases (BOUVET; GRIMONT, 1986; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008; ALSAN; KLOMPAS, 2010; ZHANG, ZHANG, QIAO, 2013; VIJAYAKUMAR, BISWAS, VEERARAGHAVAN, 2019).

Em 1986, Bouvet e Grimont, agrupam espécies geneticamente próximas através de técnicas de hibridização de DNA denominando-as de genoespécies, delinearam 12 táxons (genoespécies) para *Acinetobacter* spp.. A genoespécie 1 permaneceu com a nomenclatura que recebeu em 1911 *A. calcoaceticus*, outras 5 espécies foram nomeadas como *A. baumannii*, (genoespécie 2), *A. haemolyticus* (genoespécie 4), *A. junii* (genoespécie 5), *A. johnsonii* (genoespécie 7) e *A. lwoffii* (genoespécie 8). As demais genoespécies não foram denominadas (BOUVET; GRIMONT, 1986).

O desenvolvimento de novas técnicas moleculares possibilitou a identificação de novas genoespécies, assim, em 1989 dois grupos de pesquisadores, reclassificaram as genoespécies de *Acinetobacter* sp.; esta nova classificação foi nomeada de acordo com as iniciais dos pesquisadores, desta forma Bouvet e Jeanjean classificaram 14 genoespécies (1-14BJ), e 13 genoespécies pelo grupo de Tjernberg e Ursing (1-13TU) (BOUVET; JEANJEAN, 1989; TJERNBERG; URSING, 1989; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

Em 1991, Rossau e colaboradores, utilizando técnicas de hibridização de DNA-rRNA, perceberam a necessidade da criação de uma nova família para agrupar *Acinetobacter* e outras 2 espécies; sugeriram então a criação da família *Moraxella* em que seriam incluídos os gêneros bacterianos: *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Psychrobacter* (ROSSAU et al., 1991).

Atualmente são descritas mais 63 genoespécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter* (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html#r>), porém as características fenotípicas e bioquímicas são bastante conservadas em todas as espécies, fato que dificulta a identificação clínica destas bactérias (KETTER et al., 2014).

Devido à alta similaridade entre espécies do gênero *Acinetobacter* e à dificuldade de identificação fenotípica entre suas espécies, foi criado o complexo *A. baumannii* – *A. calcoaceticus* (complexo ABC), sendo este grupo responsável por 80% dos casos de IRAS, envolvendo espécies de *Acinetobacter*. Neste complexo estão incluídas 5 espécies: *A. calcoaceticus* (genoespécie 1), *A. baumannii* (genoespécie 2), *A. pittii* (genoespécie 3), *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU), *A. seifertii* (genoespécie próxima a 13TU) e *A. dijkshoorniae* (genoespécie próxima a 3) (KŘOGER et al., 2017; VIJAYAKUMAR, BISWAS, VEERARAGHAVAN, 2019).

Embora as espécies de *Acinetobacter* pertencentes ao complexo ABC apresentem alta similaridade entre si, os mecanismos de resistência, disseminação e epidemiologia são bastante distintos (LI et al., 2015), sendo *A. baumannii* a espécie de maior importância clínica devido à sua alta incidência correspondendo a 80% dos casos. *Acinetobacter pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. dijkshoorniae* também apresentam importância clínica, sendo relatadas em casos de infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Desta forma, das espécies pertencentes ao complexo ABC, apenas *A. calcoaceticus* não é considerada patogênica (CLARK, ZHANEL, LYNCH, 2016; VIJAYAKUMAR, BISWAS, VEERARAGHAVAN, 2019).

2.1.1 COMPLEXO *A. BAUMANNII* - *A. CALCOACETICUS* (COMPLEXO ABC)

Acinetobacter spp. é considerado um grupo heterogêneo de bactérias amplamente difundidas no ambiente, podendo ser encontrada em alimentos, como produtos lácteos e vegetais crus, ou fazendo parte da microbiota da pele e mucosas (ALMASAUDI, 2016).

Até a década de 1970, *Acinetobacter* spp. não apresentava importância clínica, entretanto a sua alta capacidade adaptativa fez surgirem isolados resistentes a diversas classes de antimicrobianos, tornando estes microrganismos um problema de saúde mundial (PEREIRA, 2013; ALMASAUDI, 2016; CLARK, ZHANEL, LYNCH, 2016).

Segundo Burnham e colaboradores (2019), 25 a 65% das IRAS causadas pelo complexo *A. baumannii-calcoaceticus* ocorrem nas primeiras 18-72h após a admissão do paciente no ambiente hospitalar. Este fato deve-se às suas

capacidades de sobrevivência em superfícies abióticas superior a de outros microrganismos, podendo sobreviver no ambiente por até cinco meses, mesmo com elevadas variações de temperatura, pH e umidade, sendo considerado um dos principais grupos bacterianos vinculados a infecções adquiridas em ambiente hospitalar no mundo (LOPEZ-ROJAS, SMANI, PACHÓN, 2013; BURNHAM, FELDMAN, CALIX, 2019; ZEIGHAMI et al., 2019).

Das espécies do complexo ABC, *A. baumannii* é a de maior importância clínica devido não só à sua maior ocorrência, como também às suas elevadas taxas de mortalidade, que podem chegar a 30-75% nos casos de pneumonias associadas à ventilação mecânica e 70% nos casos de meningites bacterianas (CLARK; ZHANEL; LYNCH, 2016; ALMASAUDI, 2016).

Um estudo comparativo entre *A. baumannii* e *A. nosocomialis* realizado por Lee e colaboradores (2013), apontou para diferenças nas taxas de mortalidade em pacientes com pneumonia causada por *A. baumannii* (34,7%) e *A. nosocomialis* (15,3%) em relação ao tempo médio de óbito. Segundo este estudo, infecções causadas por *A. baumannii* apresentaram 9 dias, enquanto as relacionadas a *A. nosocomialis* tiveram um aumento significativo de 27 dias. No mesmo trabalho, observou-se que 92,6% dos isolados de *A. baumannii* apresentaram fenótipo MDR, enquanto apenas 48,1% das cepas de *A. nosocomialis* apresentaram o mesmo perfil.

Segundo Koneman (2018), infecções e colonizações relacionadas a *A. pittii* apresentam maior frequência em infecções de pele e tecidos moles, sendo as infecções respiratórias menos frequentes quando comparadas com *A. baumannii*.

Embora a incidência das espécies do complexo ABC seja menor quando comparadas com outras gram-negativas, as taxas de resistência apresentadas pelas espécies são quatro vezes superiores às apresentadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Dentre as espécies não fermentadoras, *Acinetobacter* spp. é a segunda com maior incidência, sendo a ocorrência sendo sua taxa de ocorrência uma a cada dez infecções causadas por *P. aeruginosa* espécie de maior frequência em IRAS (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; KONEMAN, 2018).

Em trabalho publicado por Cosagaya e colaboradores (2019), foram apresentadas diferentes taxas de resistências entre as espécies pertencentes ao complexo ABC, sendo *A. seifertii* a espécie com menor resistência, apresentando

sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, e *A. baumannii* apresentou as maiores taxas de resistências a todos os antimicrobianos testados.

Os carbapenêmicos são uma classe de antimicrobianos de amplo espectro, indicados para o tratamento de *Acinetobacter* spp. MDR, entretanto sua eficácia foi reduzida a partir de 1991, quando o primeiro caso de resistência foi relatado na China (ADIBHESAMI et al., 2016). No Brasil, até 2015, a taxa de resistência a carbapenêmicos era superior a 77% (ANVISA, 2017).

Devido à falta de opção terapêutica para os casos de IRAS causadas por isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos, as Polimixinas (Polimixina B e Colistina) surgiram como última opção no tratamento destas infecções. Esta classe de antimicrobiano foi amplamente utilizada nas décadas de 1960 e 70, entretanto entrou em desuso no final da década de 1970, devido à sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade, limitando seu uso terapêutico (LEITE, 2016; CIRIONI et al., 2016, ALMASAUDI, 2016; WANG et al., 2019).

Embora *Acinetobacter* spp. tenha sido considerada uma espécie de baixa virulência, surtos envolvendo isolados hipervirulentos já foram descritos na Ásia, elevando o potencial de patogenicidade bacteriana e as taxas de mortalidade durante as infecções (ALMASAUDI, 2018; SATO et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

Além dos fatos acima elencados, a formação de biofilme e a capacidade de captar minerais do ambiente possibilita que a bactéria sobreviva por um período prolongado no ambiente (POLOTTO, 2014; CAMARGO et al., 2012).

2.2 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

Acinetobacter spp. é considerada uma bactéria oportunista e de baixa virulência, devido a maior ocorrência de indivíduos colonizados pelos microrganismos quando comparada à taxa de indivíduos infectados pela bactéria. Entretanto os crescentes relatos de casos de infecções graves com elevadas taxas de óbitos atribuídos principalmente a *A. baumannii* levou à reavaliação da espécie quanto ao seu potencial de virulência (KONEMAN, 2018; JONES et al., 2015; SATO et al., 2017)

A presença de mecanismos como: formação de biofilme, capacidade de adesão e invasão em células hospedeiras e aquisição de ferro pela presença de sideróforos aumentam a patogenicidade de *A. baumannii* e aumentam a gravidade e

a mortalidade nas infecções, principalmente quando as bactérias apresentam fenótipo MDR (JONES et al., 2015; ALMASAUDI, 2018; SATO et al., 2017).

2.2.1 Biofilme

Em 1978, o termo biofilme foi criado pelo cientista William J. Costerton para descrever um agregado microbiano aderido a superfícies. Essa estrutura pode ser considerada uma adaptação dos microrganismos ao ambiente, conferindo maiores possibilidades de sobrevivência (MANDAL, 2020).

Os biofilmes são constituídos por uma matriz de exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias. No biofilme pode conter uma ou mais espécies bacterianas; a estrutura espacial apresenta forma de pirâmide ou cogumelo com canais internos que possibilitam a difusão de nutrientes entre os microrganismos (VUOTTO; DONELLI, 2019; ZEIGHAMI et al., 2019).

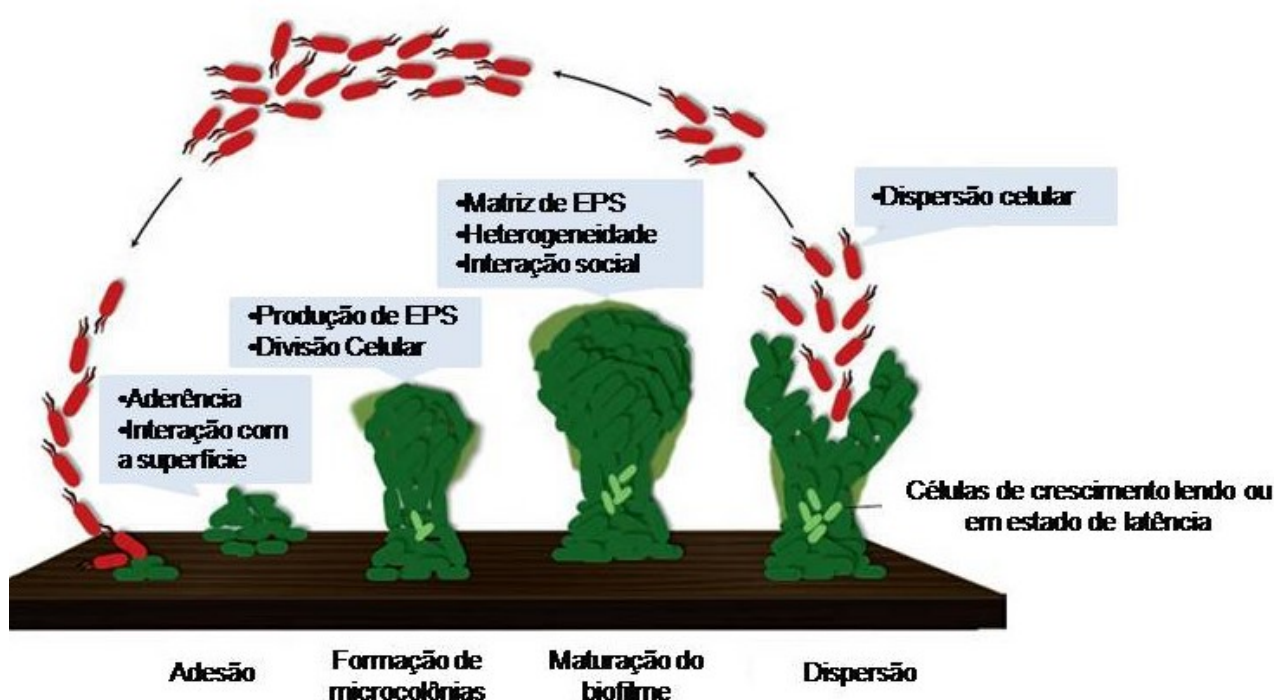
A formação do biofilme é um processo multifacetado e dinâmico que depende da expressão de diversos genes; a matriz formada é composta principalmente de exopolissacarídeos, proteínas (*Extracellular Proteins* – EPS) e ácidos nucleicos. A película formada em torno das células auxilia na proteção dos microrganismos e potencializa a troca de informações genéticas entre os indivíduos, por facilitar mecanismos como a conjugação e a transformação, promovendo uma maior disseminação de genes de resistência e virulência (MANDAL, 2020; KRZYŚCIAK et al., 2017; PAKHARUKOVA et al., 2018).

Além de auxiliar troca de informações genéticas, esta estrutura também possibilita que os microrganismos residentes desenvolvam um padrão de vida similar ao multicelular. A comunicação intercelular promove a organização da estrutura e coordenam as etapas de formação do biofilme (Figura 1), desde a adesão a superfície, ligação celular reversível e irreversível, formação de microcolônias, formação, maturação e manutenção do biofilme (VUOTTO; DONELLI, 2019; MANDAL, 2020; KRZYŚCIAK et al., 2017; PAKHARUKOVA et al., 2018).

A composição das EPS da matriz do biofilme pode variar conforme as condições de crescimento, substrato e espécies bacterianas presentes, entretanto os carboidratos glicose, galactose e manose são frequentemente os mais abundantes na estrutura (MANDAL, 2020).

Segundo Mandal (2018), além do EPS, o DNA extracelular (eDNA), derivado principalmente da lise celular, apresenta uma importante função na fixação do biofilme, interagindo com receptores presentes no substrato, auxiliando na ligação do biofilme com a superfície, também proporcionando maior estabilidade do biofilme durante sua formação.

Figura 1: Formação e estabilização do biofilme bacteriano



FONTE: MANDAL, 2020 (adaptado).

A formação de biofilme auxilia as infecções, principalmente de patógenos oportunistas, e contribui na ocorrência de infecções recidivantes. Bactérias capazes de formar biofilmes são predominantes (65 a 80%) em casos de IRAS, sendo o seu tratamento mais difícil quando comparadas a microrganismos que não apresentam este fenótipo, aumentando a gravidade das infecções e elevando o período de tratamento (VUOTTO; DONELLI, 2019; MANDAL, 2020; EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018).

O biofilme produzido pelas bactérias auxilia os microrganismos a fixarem-se em estruturas abióticas como cateteres e outros dispositivos médicos, como também

em mucosas, acarretando em fibrose cística e causando a placa bacteriana nos dentes (PAKHARUKOVA et al., 2018; ZEIGHAMI et al., 2019).

Em superfícies abióticas, o biofilme protege as bactérias do ressecamento, captura nutrientes essenciais para o metabolismo, retém água através de interação com polissacarídeos hidrofílicos e reduz a penetração dos desinfetantes, possibilitando que as colônias permaneçam por longos períodos de tempo no ambiente, mesmo com variações de pH e temperatura, fato que contribui para a disseminação bacteriana e o surgimento de surtos principalmente em UTIs (GARNACHO-MONTERO et al., 2016; KRZYŚCIAK et al., 2017; ZEIGHAMI et al., 2019).

A maior dificuldade no tratamento de infecções causadas por cepas formadoras de biofilme está relacionada à maior adesão das células bacterianas aos tecidos do hospedeiro e pela redução da penetração dos antimicrobianos, devido à barreira física conferida pela estrutura, tornando os microrganismos de 10 a 100 vezes mais resistentes aos fármacos quando comparados aos que não possuem esta capacidade (EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018; VUOTTO; DONELLI, 2019).

Ademais, a barreira física conferida pelo biofilme associadas às exoenzimas presentes no glicocálix bacteriano, com capacidade de degradar antimicrobianos, podem reduzir as concentrações dos fármacos a níveis subinibitórios, promovendo a seleção natural dos microrganismos, remetendo-os à resistência (MAH, O'TOOLE, 2001; MANDAL, 2020).

Segundo Eze e colaboradores (2018), agentes estressores, como a concentração de antibióticos abaixo da Concentração Inibitória Mínima (CIM), induzem a formação de biofilme bacteriano durante a infecção. No mesmo estudo, os autores apontam para uma maior ocorrência de *A. baumannii* produtora de biofilme em enfermarias pós-cirúrgicas, quando comparadas ao mesmo fenótipo, encontrado na clínica médica do mesmo hospital.

Dentre as espécies de *Acinetobacter* observa-se que *A. baumannii* apresenta capacidade de formação de biofilme três vezes maior que as demais espécies, sendo este fenótipo encontrado em 80-91% dos isolados de *A. baumannii* e apenas 5-24% nas demais espécies, fato que está relacionado à maior incidência de *A. baumannii* em IRAS (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018).

Isolados de *A. baumannii* coletados de amostras clínicas e de ambiente hospitalar apresentaram alta capacidade de formação de biofilme, enquanto amostras coletadas nas UTIs apresentaram uma produção aumentada, em comparação a outros setores, apontando para uma alta capacidade adaptativa da bactéria para sobreviver a condições adversas do ambiente (KRZYŚCIAK et al., 2017; EZE, CHEINA, ZOWALATY, 2018).

A formação de biofilme em *Acinetobacter* spp. envolve a ativação e expressão de diversos genes; segundo Longo e colaboradores (2014), a partir da análise gênica de isolados de *Acinetobacter* spp. formadores de biofilme, foi possível observar 1621 genes super expressos, incluindo 55 exclusivos de *A. baumannii*.

A indução da formação do biofilme em *A. baumannii* é realizada pela proteína de membrana externa OmpA, que desempenha diversas funções como alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, adesão, indução a apoptose entre outras (ANSARI et al., 2018; ZEIGHAMI et al., 2019; THUMMEEPAK et al., 2016).

Além disso, OmpA está relacionada à formação da matriz no biofilme, como foi observado por Chen et al. (2019), em que isolados de *Acinetobacter* spp. que não apresentaram o gene *ompA* tiveram uma redução na formação da matriz polimérica. Esta proteína está presente em mais de 90% nos isolados de *A. baumannii* e está associada à formação de biofilmes espessos em superfícies abióticas (YANG et al., 2019).

A. baumannii codifica um sistema de pilus tipo I, denominado Csu pili, fundamental para a formação de biofilme em superfícies abióticas; no entanto alguns estudos apontam que este sistema de pilus também poderia apresentar atividade na formação de biofilme em superfícies bióticas, contudo esta questão de tal funcionamento não está completamente elucidada (PAKHARUKOVA et al., 2018; EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018; ZEIGHAMI et al., 2019).

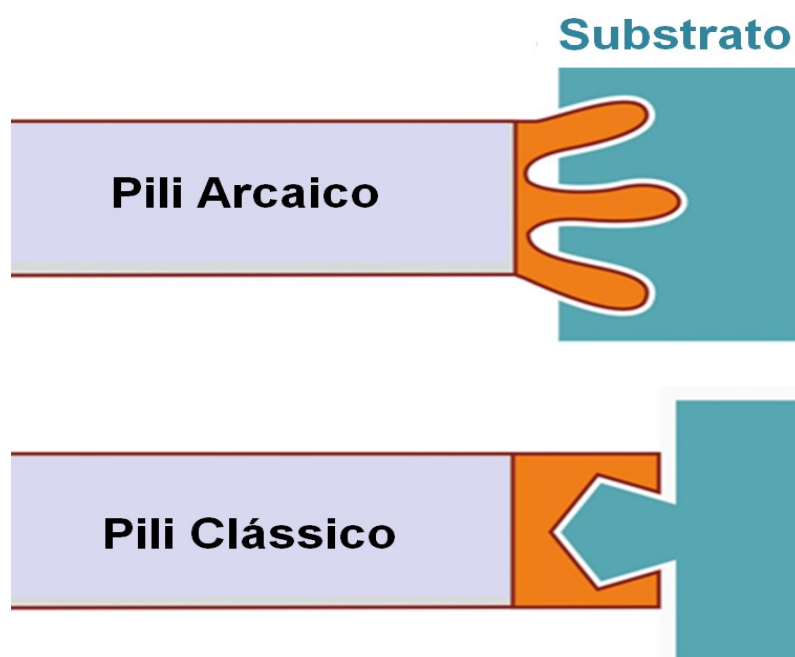
O operon *csuA/BABCDE*, responsável pela codificação das subunidades do pilus tipo I, é regulado pelo sistema de duplo componente *bfmRS*, em que *bfmS* codifica um sensor quinase que detecta condições ambientais e tem sua resposta regulatória codificada pelo gene *bfmR* (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; KRÖGER et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Estudo publicado por Kröger e colaboradores (2017), aponta para uma influência dos genes *bfmSR* na suscetibilidade bacteriana frente aos antimicrobianos. Segundo os autores, isolados que tiveram *bfmS* deletado

apresentaram aumento da CIM para Ciprofloxacina e redução para Imipenem, entretanto cepas que tiveram *bfmR* deletado apresentaram aumento da CIM para Meropenem e Colistina.

O gene *csuE* desempenha um papel fundamental na formação do biofilme em *A. baumannii*, sendo responsável pela formação da estrutura proteica com 3 *loops* hidrofóbicos em forma de dedos, constituindo um pili arcaico capaz de se ligar a cavidades de estruturas abióticas (Figura 2) (KRÖGER et al., 2017; PAKHARUKOVA et al., 2018; EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018; ZEIGHAMI et al., 2019; YANG et al., 2019).

Figura 2: Estrutura de ligação do pilus arcaico com superfícies abióticas formado por *csuE*.



Fonte: PAKHARUKOVA et al., 2018 (adaptado).

A adesão bacteriana e formação de microcolônias que inicializam o biofilme é dependente da expressão de *csuE* e a deleção deste gene reduz a capacidade de formação de biofilme em *A. baumannii* (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; EZE; CHEINA; ZOWALATY, 2018; ZEIGHAMI et al., 2019; YANG et al., 2019).

Isolados bacterianos que apresentam o gene *bap* dispõem de maior capacidade para formação de biofilme em materiais clinicamente relevantes como titânio e poliestireno. Na etapa de maturação e manutenção do biofilme, a Proteína Associada a Biofilme (Bap) é responsável pela adesão intracelular e formação de

canais, além de aumentar a aderência de *A. baumannii* aos tecidos (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; ZEIGHAMI et al., 2019; YANG et al., 2019).

2.2.2 Pili tipo IV

Os pili tipo IV são estruturas extracelular e estão amplamente difundidas em bactérias gram-negativas e gram-positivas, apresentando diversas funções como: transferência genética horizontal, adesão patógeno-hospedeiro, aumento da adesão célula-célula que gera microcolônias na formação do biofilme e motilidade celular (PIEPENBRINK et al., 2016; VIJAYAKUMAR et al., 2016; CHLEBEK et al., 2019).

A estrutura formada pelo pilus tipo IV apresenta componentes citoplasmáticos responsáveis pelo ancoramento e extracelulares com funções variadas. A porção extracelular forma uma fibra com diâmetro de 6-9 nm podendo atingir até 2,5µm em algumas espécies. Esta estrutura é formada de uma subunidade proteica única chamada de pilina principal, que apresenta formato helicoidal com capacidade de distensão e contração; esta fibra pode apresentar subunidades de pilinas menores incorporadas que podem alterar a função da estrutura (PIEPENBRINK et al., 2016; LEONG et al., 2017; CHLEBEK et al., 2019).

A motilidade associada ao pilus dá-se através de contrações da estrutura (Twitching), desta forma o microrganismo estende à estrutura que é ancorada a uma superfície e posteriormente contrai o pilus deslocando a bactéria; tal motilidade é coordenada por reguladores sensoriais e por um complexo quimiossensorial (ROCA et al., 2012; BISWAS; MACHEH; METTLACH, 2019)

Espécies bacterianas como *Vibrio cholarea* e *Streptococcus pneumoniae* utilizam a estrutura do pilus para aquisição de material genético durante o processo de transformação; a captura do eDNA ocorre por mecanismos similares aos utilizados para o deslocamento da célula, em que há a extensão do pilus, captura e absorção do material (LEONG et al., 2017; CHLEBEK et al., 2019).

Embora o gênero *Acinetobacter* tenha recebido esta denominação devido a não motilidade, algumas espécies como *A. baumannii* e *A. nosocomialis* apresentam sistema de pili tipo IV. Em *A. baumannii*, a formação do pili tipo IV envolve a expressão de diversos genes (*pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilF*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU*, *pilZ* e *pilV*), envolvidos na montagem da estrutura, expansão e

contração da estrutura (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; CHEN et al., 2017; CHLEBEK et al., 2019; LEONG et al., 2017; VIJAYAKUMAR et al., 2016).

A biossíntese dos pili tipo IV e a capacidade de movimentação de *A. baumannii*, observada principalmente em superfícies úmidas, meios semi-sólidos e líquidos, é influenciada pela presença de componentes químicos, incidência de luminosidade, deficiência em ferro entre outros fatores de estresse (VIJAYAKUMAR et al., 2016; LEONG et al., 2017).

2.2.3 Sideróforos

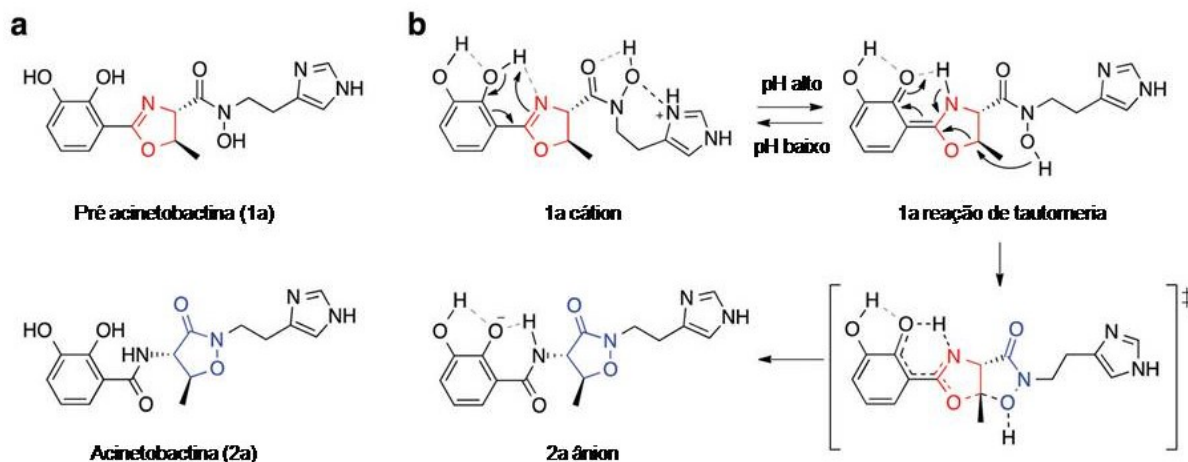
Os sideróforos são pequenas moléculas que desempenham função de quelantes de grande afinidade com o ferro, desempenhando um importante papel para o mecanismo de sobrevivência bacteriana (KONEMAN, 2018; HU et al., 2019; PENWELL; ACTIS, 2019).

Durante infecções e colonizações em animais, os sideróforos são de fundamental importância, pois a quantidade de ferro livre disponível é reduzida, em vertebrados a maior parte do ferro encontra-se armazenada em estruturas como: hemoglobina, mioglobina, ferritina e transferrina, sendo necessária a ação dos sideróforos para a sua captura (MORTENSEN; SKAAR, 2013; BAILEY et al., 2018; PENWELL; ACTIS, 2019).

Em *A. baumannii* cinco diferentes grupos de sideróforos foram descritos na literatura, sendo a acinetobactina (catecol-hidroxiatoma) o mais conservado na espécie e é composto por N-hidroxi-histamina, L-treonina e ácido 2,3-dihidroxibenzóico (DHBA), tendo 19 genes envolvidos nas etapas de síntese, secreção e reabsorção do quelante (AGHAJANI; RASOOLI; MOUSAVI, 2019; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; PENWELL; ACTIS, 2019).

A síntese e a conservação de acinetobactina apresenta influência do pH, sendo sua produção aumentada em ambientes básicos e neutros. O sideróforo é biossintetizado em uma forma de pré-acinetobactina chamada de oxazolina (1a) (Figura 3). Esta oxazolina é secretada para o meio extracelular, onde sofre isomerização espontaneamente, formando acinetobactina isooxazolidiona (2a); a velocidade desta reação é diretamente influenciada pelo pH, ocorrendo mais rapidamente em meio básico (AGHAJANI, RASOOLI, MOUSAVI, 2019; SHAPIRO, WENCEWICZ, 2017; BAILEY et al., 2018).

Figura 3: Estrutura da Acinetobactina



Fonte: SHAPIRO, WENCEWICZ, 2017 (adaptado).

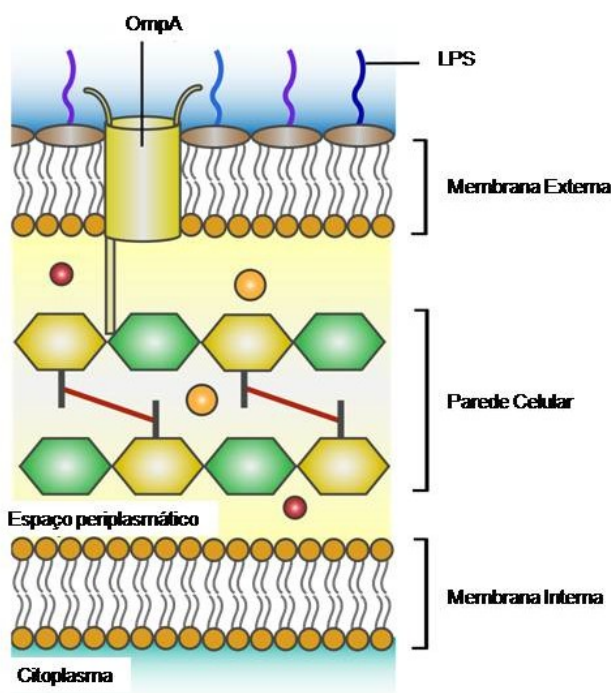
(a) Estrutura da pré-acinetobactina (1a) e acinetobactina (2a). (b) Mecanismo de isomerização da pré-acinetobactina oxazoline (1a) em acinetobactina isoxazolidnone (2a).

Dentre os genes necessários para a síntese de acinetobactina, *bas*, *bau* e *bar* codificam informações necessárias para a produção, transporte e secreção, respectivamente. Entre outros lócus, encontra-se o gene *entA*, que codifica a enzima 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxi-benzoato desidrogenase, fundamental para a formação da porção catecol do sideróforo (PENWELL; ARIVETT; ACTIS, 2012; MORTENSEN; SKAAR, 2013; PENWELL; ACTIS; 2019; SHAPIRO; WENCEWICZ, 2017).

2.2.4 Proteínas de membrana externa - Outer Membrane Proteins (Omps)

As proteínas de membrana externa - *Outer Membrane Proteins* (Omps) são proteínas transmembrana que formam poros na membrana externa de bactérias gram-negativas, controlando boa parte da entrada de substâncias nas células bacterianas. As Omps podem apresentar estruturas monoméricas ou triméricas e permitem o transporte ativo de substâncias hidrofílicas (Figura 4) (KONEMAN, 2018).

Figura 4: Estrutura externa de bactérias gram-negativas, indicando a membrana externa, camada de peptidoglicano e membrana interna apontando a localização das porinas.



Fonte KONEMAN, 2018.

A permeabilidade seletiva apresentada pelas Omps confere a algumas bactérias resistência a diversas classes de antimicrobianos e apresentam um importante fator na patogenicidade e adaptação nas células do hospedeiro (KONEMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018).

Em *A. baumannii*, a principal proteína de membrana externa é a OmpA, altamente conservada em gram-negativas, sendo encontrada nas espécie do complexo ABC. A porina contribui para a virulência e patogenicidade bacteriana, pois infecções decorrentes de *A. baumannii* com fenótipo de super expressão de *ompA* estão associadas ao desenvolvimento de pneumonias e bacteremias com taxas de mortalidade elevadas (KWON et al., 2017; PARRA-MILLÁN et al., 2018; SÁNCHEZ-ENCINALES et al., 2017; AN et al., 2019; IYER et al., 2017; KIM et al., 2016; ZEIGHAMI et al., 2019).

O gene *ompA* também está vinculado à indução da formação de biofilme e à capacidade de disseminação bacteriana entre órgãos durante processos infecciosos, visto que isolados que tiveram o gene deletado apresentaram capacidade de disseminação reduzida e menores índices de desenvolvimento de pneumonias

secundárias *in vivo* quando comparadas com isolados produtores de OmpA (ZEIGHAMI et al., 2019; ANSARI et al., 2018; KIM et al., 2016; AN et al., 2019; SÁNCHEZ-ENCINALES et al., 2017).

Dentre as múltiplas funções apresentadas por OmpA, destaca-se o aumento da aderência bacteriana a superfícies e a responsabilidade pela interação com células dos hospedeiros (ZEIGHAMI et al., 2019; ANSARI et al., 2018; AN et al., 2019; IYER et al., 2017; KIM et al., 2016).

Além de contribuir para os aumentos da virulência e patogenicidade, *ompA* desempenha função na resistência intrínseca de espécies do complexo ABC, devido seu envolvimento na exportação de vesículas contendo agentes inibidores de antimicrobianos para o meio extracelular e alteração na permeabilidade da membrana, reduzindo a penetração de diversos antimicrobianos (ZEIGHAMI et al., 2019; ANSARI et al., 2018; IYER et al., 2017; KWON et al., 2019).

Em trabalho publicado por Kwon e colaboradores (2019), demonstra-se que alteração em OmpA de *A. nosocolialis* apresentou alteração direta no CIM de diversos antimicrobianos, resultando no aumento da sensibilidade à Colistina em 20 vezes e à Gentamicina superior a 4 vezes, quando comparadas a isolados com OmpA conservado. Os pesquisadores também avaliaram a alteração nos CIMs de *A. baumannii* após a deleção de *ompA*, obtendo aumento da sensibilidade para a maioria dos antimicrobianos quando comparados com isolados produtoras de OmpA (KWON et al., 2019; KWON et al., 2017).

2.3 TIPAGEM MOLECULAR

A caracterização clonal de cepas bacterianas é uma importante ferramenta para monitoramento epidemiológico, identificação da origem de um surto e identificação de disseminação bacteriana inter ou intra-hospitalar (ALJINDAN, ALSAMMAN, ELHADI, 2018; CAMARGO et al., 2012). Para tanto, os isolados são divididos em grupos de acordo com a taxa de similaridade gênica que apresentam. Esta separação permite identificar indivíduos pertencentes ao mesmo clone, a fim de identificar a disseminação bacteriana ou identificar cepas endêmicas (POLOTTO, 2014; CAMARGO et al., 2012).

Além disso, esta ferramenta auxilia na avaliação da disseminação da resistência e virulência entre os isolados bacterianos, bem como na identificação de

surtos causados por cepas hipervirulentas ou com fenótipo MDR (POLOTTO, 2014; CAMARGO et al., 2012).

2.4 MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema de saúde global que vem aumentando a cada ano em todo mundo, acarretando infecções graves, prolongamento no período de hospitalização e, muitas vezes, na morte do paciente (DOMINGUES et al., 2012).

2.4.1 Mecanismos de ação dos β -lactâmicos

Em 1928, Alexander Fleming observou que uma placa com cultura bacteriana contaminada por um fungo do gênero *Penicillium*, microrganismo que produzia uma substância que inibia o crescimento bacteriano. Somente em 1940, no entanto, Howard Florey e Ernest Chain conseguiram isolar e produzir em grande escala a substância que, posteriormente, foi nomeada de Penicilina (TAN; TATSUMURA; 2015).

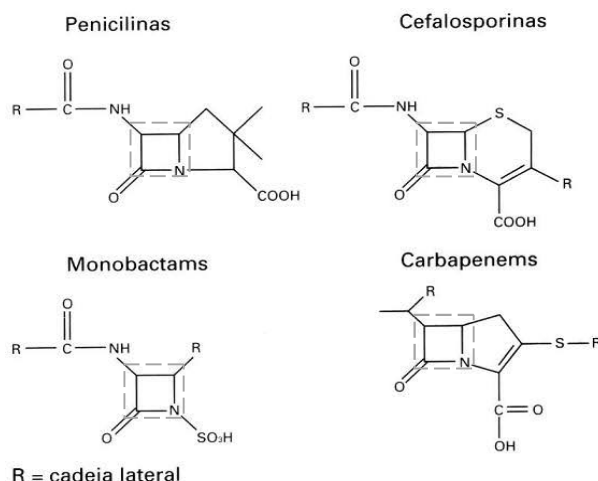
Após mais de 70 anos da descoberta de Fleming, os β -lactâmicos, antimicrobianos da classe das penicilinas, permanecem sendo os fármacos mais utilizados na clínica médica. Nesta classe atualmente se incluem: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos e Carbapenêmicos, além de suas combinações com inibidores de β -lactamases (FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013; BUSH; BRADFORD, 2016; WATKINS; BONOMO, 2017).

Nos Estados Unidos, os β -lactâmicos representam 65% dos antimicrobianos utilizados, fato que se dá devido à grande eficácia apresentada por estes fármacos no tratamento de infecções bacterianas e por apresentarem baixa toxicidade, apesar de estarem relacionados a respostas alérgicas mais comuns, causadas especialmente por penicilinas e cefalosporinas (BUSH; BRADFORD, 2016).

Na sua estrutura química, estes antimicrobianos apresentam um anel β -lactâmico composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio, formando uma amida cíclica tensionada e reativa (Figura 5). A principal forma de entrada dos antimicrobianos nas células bacterianas ocorre por transporte ativo, através das porinas que permitem a passagem de substâncias hidrofílicas e apresentam

afinidade específica pelos diferentes antimicrobianos (FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013; KONEMAN, 2018).

Figura 5: Estrutura química dos principais β -lactâmicos, apresentando a estrutura do anel β -lactâmico circulado pela linha tracejada.



Fonte: KONEMAN, 2018 (adaptado).

Bactérias gram-positivas e gram-negativas apresentam parede celular, estrutura que é responsável pela forma bacteriana e por sua rigidez. A pressão osmótica no interior da célula é de 10 a 15 vezes maior que a do exterior, assim a ausência desta estrutura faria a célula entumescer e romper-se, acarretando na sua morte (TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2018; WATKINS, BONOMO, 2017).

A síntese da parede celular ocorre em três etapas e em locais distintos, iniciando no citoplasma, seguindo para a membrana e sendo finalizada no meio externo à membrana. Os antimicrobianos β -lactâmicos atuam interferindo na etapa de finalização da estrutura, fixando-se às proteínas de ligação à penicilina (*penicillin-binding proteins* - PBPs) (TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2018; WATKINS, BONOMO, 2017).

Ao se ligar às PBPs, o fármaco impede que ocorra a ligação cruzada entre os filamentos responsáveis pela rigidez da estrutura que compõem a parede celular, acarretando na desestabilização da célula, que culmina com sua lise (BUSH; BRADFORD, 2016; WATKINS; BONOMO, 2017). Uma bactéria pode apresentar entre dois a oito diferentes PBPs, com funções distintas que vão desde a manutenção da parede celular até a criação do septo de citocinese. As PBPs podem variar de acordo com a espécie bacteriana, apresentando afinidades por um fármaco

distinto, tornando necessária a existência de variações entre os antimicrobianos (ZENG; LIN, 2013; WATKINS; BONOMO, 2017).

2.4.2 Mecanismo de Resistência aos β -lactâmicos

A descoberta de Fleming impulsionou a pesquisa a antimicrobianos; entre as décadas de 1940 e 1960, inúmeros fármacos foram desenvolvidos, acreditando-se que tinha sido encontrada a cura para todas as infecções bacterianas. Décadas de uso indiscriminado de antimicrobianos, contudo, culminou com o surgimento de cepas bacterianas resistentes (MASCI et al., 2019; MULANI et al., 2019).

Para sobreviver à ação dos antimicrobianos, a alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, bombas de efluxo e alteração no sítio de ligação das PBPs foram algumas de inúmeras estratégias desenvolvidas pelas bactérias para a sua sobrevivência. Entre tais estratégias, inclui-se a produção de β -lactamases, que se tornou a causa mais importante e comum para o aumento de resistência, principalmente em bactérias gram-negativas (WATKINS; BONOMO, 2017; KONEMAN, 2018; BUSH; BRADFORD, 2016).

As β -lactamases são enzimas que clivam a ligação amida do anel β -lactâmico. Foram classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos que apresentam, sendo a classificação de Ambler a mais usual, que, desenvolvida em 1995, agrupa as enzimas em 4 categorias: A, B, C e D. (KONEMAN, 2018; FERNANDES, AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013). Bush e Jacoby (2010) sugeriram uma nova classificação para as β -lactamases, considerando as características funcionais e moleculares das enzimas (Tabela 1) (BUSH; JACOBY, 2010; KONEMAN, 2018).

Tabela 1: Classificação das β -lactamases de acordo com Ambler e Busch-Jacoby.

Busch-Jacoby (2010)	Classificação de Ambler	Enzimas	Local Ativo	Substrato Antimicrobiano ^a	Inibidores Enzimáticos ^b	Presente em:
Grupo 1 Cefalosporinas	C	AmpC	Serina	Hidrolisa Cefalosporinas	PBA, DPA, CLOXACILINA	<i>Enterobacteriaceas</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.
Grupo 2bf Carbapenemases	D	OXA-23, OXA-48, OXA-51	Serina	Hidrolisa carbapenêmicos	Variável com CV ou TZ	<i>A. baumannii</i>
Grupo 2f Carbapenemases	A	KPC-2, SME-1, IMI-1', GES	Serina	Hidrolisa Carbapenêmicos, Oximino-cefalosporinas e cefamicinas	Variável com CV ou TZ	<i>Enterobacteriaceas</i>
Grupo 3	B	IMP-1,	Zinco	Hidrolisa	Variável com CV	<i>P. aeruginosa</i>

Metalo-beta-lactamases	VIM-1, IND-1 NDM	carbapenêmicos mas não os monobactâmicos	ou TZ	<i>A. baumannii</i>
------------------------	------------------------	--	-------	---------------------

Fonte: Koneman (2018), adaptada.

Abreviações: ^a Oximino-cefalosporinas = cefotaxima, ceftazidina, ceftriaxona, cefepima, aztreonam. Cefamicinas = cefoxitina, cefotetama

^b PBA = ácido fenilborônico, DPA = ácido dipicolínico, CV = ácido clavulânico, TZ = Tazobactam.

Para potencializar a atuação dos antimicrobianos e inibir a ação das β -lactamases, diversos fármacos β -lactâmicos são ministrados juntamente com inibidores de β -lactamases, a fim de impedir a ação das enzimas. Estes inibidores apresentam estrutura semelhante às dos fármacos, não dispendo, porém, de atividade bactericida; tais compostos apresentam alta afinidade com as enzimas ligando-se a elas, impedindo a destruição do fármaco e possibilitando a ação total ou parcial do antimicrobiano. Atualmente os inibidores de β -lactamases mais utilizados na clínica médica são o Ácido Clavulâmico, o Sulbactam, o Tazobactam e, mais recentemente, o Avibactam.

2.4.3 Carbapenemases

Os carbapenêmicos são antimicrobianos de amplo espectro, baixa toxicidade e alta eficácia no tratamento de *Acinetobacter* spp.. Estes fármacos foram utilizados como última opção no tratamento destas bactérias com fenótipo MDR até 1991, quando foram relatados os primeiros casos de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (ADIBHESAMI et al., 2013; KONEMAN, 2018).

Embora mecanismos como superexpressão de bomba de efluxo, alteração de proteínas de membrana e formação de biofilme por *Acinetobacter* spp. contribuam para a resistência aos carbapenêmicos, observa-se que esta resistência dá-se principalmente pela produção de carbapenemases do tipo Oxacilinase (OXA) pertencentes a classe D de Ambler (DE SÁ CAVALCANTI et al., 2017).

As enzimas do tipo OXA receberam esta denominação, devido à sua capacidade de hidrolizar Oxaciclina. Atualmente mais de 365 variantes de OXA foram identificados com espectro de ação, variando entre cefalosporinas de amplo espectro a carbapenêmicos. Estas enzimas estão agrupadas em cinco subgrupos filogenéticos: *bla*_{OXA23LIKE}, *bla*_{OXA51LIKE}, *bla*_{OXA48LIKE}, *bla*_{OXA51LIKE}, *bla*_{OXA24-40LIKE} e *bla*_{OXA143LIKE} (POLLITO, 2014).

As Oxacilinasas são enzimas codificadas pelo gene OXA, genes cromossômicos descritos primeiramente em *Acinetobacter* spp. Estas enzimas

apresentam uma serina no seu sítio ativo que lhes confere a capacidade de hidrolizar carbapenêmicos. Embora as enzimas do tipo OXA tenham sido primeiramente localizadas em cromossomos de *Acinetobacter* spp., relatos de *Enterobacteriaceas* que abrigavam os genes *bla*_{OXA23} e *bla*_{OXA48} apontaram para a transferência dos genes para plasmídeos e uma disseminação dos genes para outras espécies de gram-negativas (KONEMAN, 2018; HRENOVIC et al., 2019; CHAGAS, 2015).

A β -lactamase OXA-51, bem como a cefalosporinase AmpC, são codificadas por genes abrigados em cromossomos presentes em todos os isolados de *A. baumannii*; entretanto a expressão dos genes *bla*_{OXA51} e *ampC* podem apresentar expressão baixa, conferindo resistência variável ao antimicrobianos (KONEMAN, 2018; HRENOVIC et al., 2019).

OXA-51 foi descrita pela primeira vez, em 2004, em isolados de *A. baumannii*. Atualmente pequenas variações de 1 a 15 aminoácidos foram detectadas nas enzimas, desta forma motivando a criação de um subgrupo denominado de família OXA-51 *like*, constituída pelas enzimas: OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-50, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250 e OXA-254 (CHAGAS, 2015).

Os genes *bla*_{OXA51LIKE} são exclusivos de *A. baumannii* e abrigados em todos os isolados da espécie, por este motivo a identificação da espécie pode ser realizada pela detecção destes genes (EVANS et al., 2008).

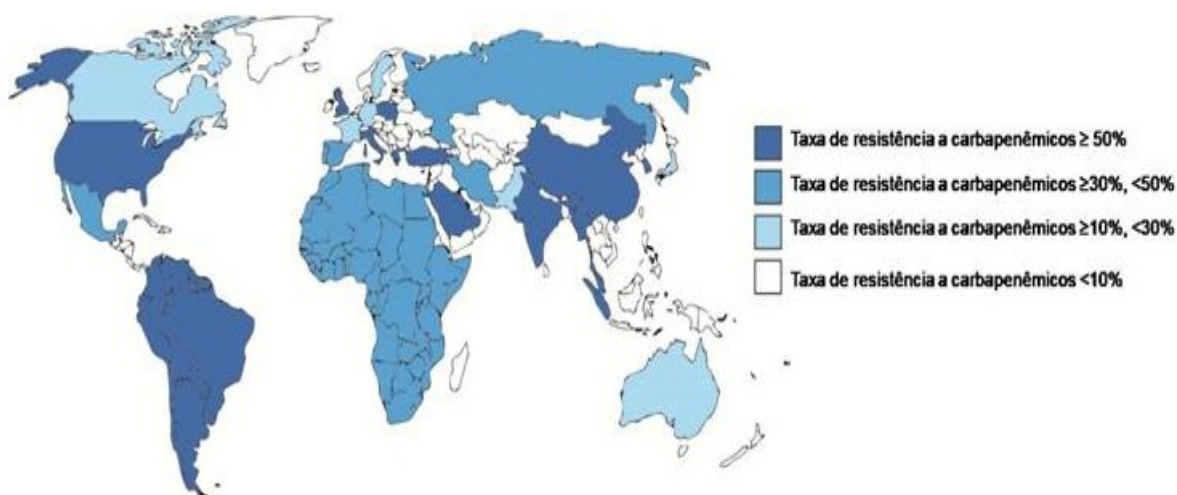
As Carbapenemases OXA-23 foram primeiramente localizadas em cromossomos de *Acinetobacter* spp.; atualmente o gene para esta enzima disseminou-se entre outras espécies bacterianas, por terem sido copiadas para plasmídeos. A enzima OXA-23 é classificada na classe D de Ambler, como primeiro grupo de β -lactamases do tipo OXA a conferir resistência a carbapenêmicos, capaz de hidrolisar cefalosporinas e carbapenêmicos de amplo espectro (BUSH; JACOBY, 2010; HRENOVIC et al., 2019; PAUL et al., 2017).

A família OXA-23 *like* compreende as enzimas: OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225 e OXA-239; tais enzimas foram descritas em *Acinetobacter* spp.

e *Enterobacteriaceae*, indicando a disseminação do gene (CHAGAS, 2015; PAUL et al., 2017).

Atualmente *A. baumannii* produtora de carbapenemases está amplamente disseminada em todo mundo (Figura 6), chegando a 86% dos isolados clínicos na Croácia, em 2016, e chegando a 77,4% no Brasil, em 2015. A taxa de mortalidade associada a esta espécie é superior a 70% em pacientes internos em UTIs (ALMASAUDI, 2016; LAHIRI et al., 2019; ANVISA, 2017; HRENOVIC et al., 2019).

Figura 6: Epidemiologia global de *Acinetobacter* spp. resistentes a Carbapenêmicos em 2014.



Fonte: CHAGAS, 2015 (adaptado).

Além das carbapenemases do tipo OXA, *Acinetobacter* spp. também pode abrigar, com menor frequência, enzimas pertencentes à classe A de Ambler, o maior grupo de β -lactamases estudado; neste grupo estão as codificadas por genes plasmidiais *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) e *bla_{GES}* (*Guiana extended-spectrum*). Embora estas enzimas não sejam as mais incidentes em *Acinetobacter* spp., a coexistência destas com enzimas de outras classes potencializa a resistência bacteriana aos antimicrobianos (CHAGAS, 2015; EL-HAFA et al., 2019; AL-AGAMY et al., 2017).

2.4.4 Metallo- β -lactamases

As Metallo- β -lactamases (MBLs) são enzimas da classe B de Ambler capazes de hidrolisar quase todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Estas

enzimas apresentam um sítio ativo que contém um íon zinco e foram identificadas na década de 1980 em uma bactéria não patogênica (CHAGAS, 2015).

As quatro MBLs mais frequentes em *Acinetobacter* spp. são: NDM (*Nova Deli Metallo- β -lactamase*), IMP (*Imipenemase*), SIM (*Seoul Imipenemase*) e VIM (*Verona metalo- β -lactamase*) (ABOUELFETOUEH; TORKY; ABOULMAGD, 2019).

Embora a taxa de ocorrência das MBLs em isolados de *Acinetobacter* spp. ainda seja baixa no Brasil (Figura 7), a facilidade de disseminação destes genes é bastante preocupante, pois a sua presença amplia o espectro de resistência bacteriana e reduz as possibilidades opções terapêuticas utilizadas no tratamento (CHAGAS, 2015).

Figura 7 Distribuição geográfica do gene bla_{NDM} em 2015.



Fonte: Chagas, 2015 (adaptado).

2.4.5 Polimixinas

As polimixinas foram isoladas pela primeira vez em 1947 da bactéria gram-positiva *Bacillus polymyxa*; em 1993 foi classificada como *Paenibacillus polymyxa*. Em 1949, vários complexos de polimixinas haviam sido descobertos, entretanto, devido à alta toxicidade apresentada pelos fármacos, apenas as Polimixinas B e E (Colistina) foram liberadas para o uso clínico, mesmo apresentando alta nefrotoxicidade (DOMINGUES et al., 2012; TRIMBLE et al., 2016; GALLARDO-GODOY et al., 2019; GIRARDELLO, 2012).

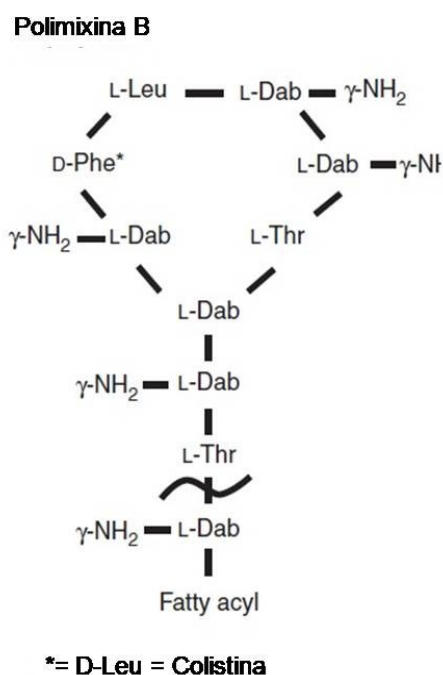
Alguns estudos demonstram que a nefrotoxicidade do fármaco é superior a 50%. Na década de 1980, as Polimixinas foram gradativamente substituídas por outros fármacos, devido a relatos de necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda devido ao seu uso, além da presença de resíduos do medicamento em

tecidos renal e nervoso (DOMINGUES et al., 2012; TRIMBLE et al., 2016; GALLARDO-GODOY et al., 2019; GIRARDELLO, 2012; VELKOV, ROBERTS, 2019).

Apesar da elevada toxicidade, as Polimixinas foram reintroduzidas na clínica médica como fármaco de última escolha no tratamento de bactérias MDRs, entretanto, pouco tempo após a reinserção dos fármacos na terapêutica, houve relatos do surgimento de isolados resistentes (ROCHA, 2017; KO; CHOI; LEE, 2017).

Estes fármacos são pequenos peptídeos policatiônicos de 1200 Da, compostos por um anel cicloheptaptídeo e três caudas exocíclicas de aminoácidos e dois ácidos graxos. Diferem principalmente por uma única D-fenilalanina (D-Phe), substituído por uma D-leucina (D-Leu) dentro do peptídeo anel. O anel catiônico torna o fármaco solúvel em água, entretanto a cadeia acila facilita sua inserção na membrana bacteriana (Figura 8) (DOMINGUES et al., 2012; TRIMBLE et al., 2016; GALLARDO-GODOY et al., 2019).

Figura 8: Fórmula química da Polimixina B indicando local de substituição de D-Phe por D-leu originando a fórmula da Colistina.



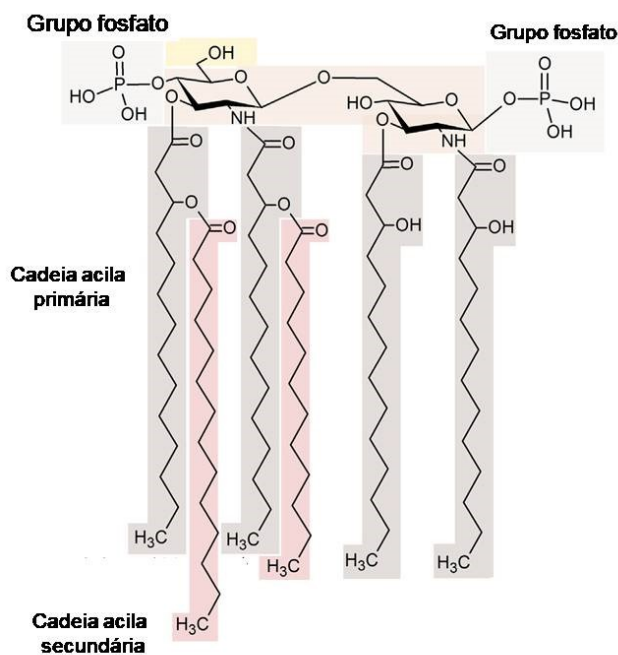
Fonte: TRIMBLE et al., 2016 (adaptado).

2.4.6 Mecanismos de ação das Polimixinas

As Polimixinas são antimicrobianos indicados para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, devido à sua alta afinidade ao lipopolissacarídeo (LPS) presente nestes microrganismos. O LPS está localizado na face extracelular da membrana externa de gram-negativas; um dos principais constituintes desta camada é uma endotoxina hidrofóbica denominada Lipídio A que ancora o LPS na porção externa da membrana, devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas derivadas da alta afinidade entre o grupo fosfato do lipídeo A e os cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} presentes na estrutura da membrana. Esta ligação promove a estabilização do LPS (GALLARDO-GODOY et al., 2019; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019; KONEMAN, 2018; KINOSHITA, et al, 2018).

A estrutura do lipídeo A é constituída por um dissacarídeo glicosamina difosforilado, contendo seis cadeias acilas primárias e secundárias que se encontram unidas através de ligações diéster, orientadas para o interior da membrana por atração hidrofóbica (Figura 9) (STEIMLE; AUTENRIETH; FRICK, 2016).

Figura 9: Estrutura do Lipídeo A.



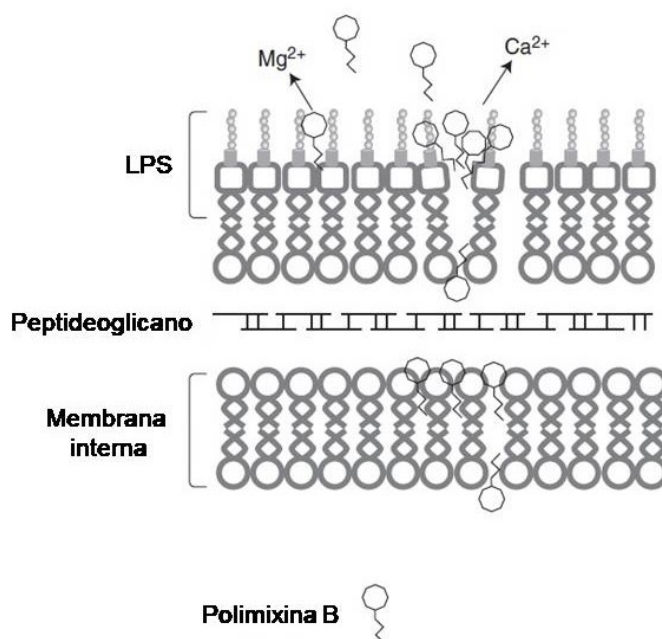
Fonte: STEIMLE; AUTENRIETH; FRICK, 2016 (adaptado).

A especificidade das Polimixinas em relação às bactérias gram-negativas dá-se devido à grande afinidade que o fármaco apresenta pelo lipídio A. Esta afinidade ocorre por conta da carga negativa presente no lipídeo, conferida pela presença de um grupo fosfato livre presente na estrutura (MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019).

A ação das Polimixinas ocorre devido a interações eletrostáticas entre os grupamentos dos ácidos diaminobutílicos (Dab) com carga positiva presentes nas Polimixinas e os grupos fosfatos carregados negativamente no lipídeo A, e interações hidrofóbicas entre os resíduos D-Phe/D-Leu (Polimixina B, Colistina) e a cadeia de gordura acil do lipídeo A (VELKOV; ROBERTS, 2019).

A ligação entre Polimixina e Lipídeo A acarreta no deslocamento dos cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} , desestabilizando a camada de LPS, levando ao aumento da permeabilidade e ruptura da membrana e, consequentemente, ao extravasamento do material citoplasmático e a morte bacteriana (Figura 10) (GALLARDO-GODOY et al., 2019; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019; TRIMBLE et al., 2016; KINOSHITA et al., 2018; KINOSHITA et al., 2018; VELKOV; ROBERTS, 2019).

Figura 10: Mecanismo de ação da Polimixina B, apontando a interação do fármaco com o LPS e o deslocamento de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , provocando a desestabilização da LPS e rompimento da membrana.



Fonte: TRIMBLE et al., 2016 (adaptado).

2.4.7 Mecanismos de Resistência às Polimixinas

A resistência às Polimixinas é conferida pela alteração na polaridade da camada de LPS, através de alterações na carga negativa do Lipídeo A, reduzindo a atração eletrostática e impedindo a ligação do fármaco (KO; CHOI; LEE, 2017; CHIN et al., 2015; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019).

A resistência a Polimixinas em *Acinetobacter* spp. está associada principalmente a mutações no gene *pmrB*, gene que codifica uma histidina quinase ligada à membrana. Esta quinase pertence a um sistema regulatório de dois componentes, responsáveis pela ativação de PmrA, proteína reguladora da expressão de *pmrC* (MARTINS-SORENSEN et al., 2019; CHIN et al., 2015; KO; CHOI; LEE, 2017; NHU et al., 2016).

Mutações nos genes *pmrA* e *pmrB* levam à regulação positiva do operon *pmrABC*, acarretando na síntese e adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, reduzindo a carga negativa da LPS e, por fim, impedindo a ligação das Polimixinas (MARTINS-SORENSEN et al., 2019; CHIN et al., 2015; KO; CHOI; LEE, 2017; NHU et al., 2016).

Embora os primeiros relatos de resistência a polimixinas tenham sido em decorrência de mutações em genes cromossômicos, em 2015 foi relatada na China a primeira ocorrência de resistência ao fármaco, decorrente da presença de plasmídeo. Este gene recebeu o nome de *mcr* devido à enzima fosfoetanolamina transferase (enzima MCR) codificada por ele (MARTINS-SORENSEN et al., 2019).

Atualmente nove genes da família *mcr* foram descritos, apresentando disseminação mundial; no Brasil já foi relatada a ocorrência dos genes plasmídicos *mcr1*, 3 e 4. A resistência mediada pelo plasmídeo apresenta o mesmo mecanismo relacionado a mutações cromossômicas, visto que a enzima MCR é responsável pela adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A. (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; MARTINS-SORENSEN et al., 2019; KIEFFER et al., 2018).

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de pacientes com IRAS em dois hospitais da rede pública e um da rede privada de Maceió-AL, no período de junho a dezembro de 2018, por demanda espontânea dos hospitais.

As cepas utilizadas foram previamente isoladas e identificadas nos laboratórios de microbiologia dos hospitais, através de métodos bioquímicos preconizados pela CLSI – 2018, e a identificação do perfil MDR foi realizada através de disco difusão, foram testados antimicrobianos das classes: Quinolonas, Fluorquinolonas, Aminoglicosídeos, Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos, e carbapenêmicos, a resistência foi determinada de acordo com os antibióticos e com o tamanho do halo formado pelo crescimento bacteriano, conforme as normas pré-estabelecidas para cada espécie de acordo com a CLSI – 2018 (PATEL et al., 2017).

A avaliação do fenótipo quanto à resistência foi realizada de acordo com a definição da CLSI – 2018 e ANVISA – 2018, em quem são considerados MDR os isolados que apresentem resistência a pelo menos um fármaco de três classes e com resistência extensiva – XDR os isolados que apresentem resistência a pelo menos um fármaco de todas as classes ou a falta de resistência a no máximo duas classes de antimicrobianos. Os isolados que não apresentaram perfil MDR ou gram-positivos foram descartados.

Os isolados bacterianos foram coletados com swabs e armazenados em tubos contendo meio Stuart Kasvi®, de acordo com as instruções do fabricante, e transportados em caixa de transporte com padrão UN 3373, de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2015).

Todas as amostras foram semeadas em Ágar *Eosin Methylene Blue Levine* (EMB - Levine) Kasvi®, meio diferencial para bactérias gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 – 48 h, e o fenótipo das colônias formadas foi analisado a cada 24 h, a fim de identificar possíveis contaminantes ou presença de diferentes espécies na amostra. A presença de colônias em EMB com morfologia ou coloração diferente foram repicadas e armazenadas como isolados diferentes.

As amostras que não apresentaram crescimento em EMB foram semeadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 – 48 h; para os tubos que apresentaram turvação do meio, as bactérias foram semeadas em EMB, de acordo com o método acima descrito, as cepas que não apresentaram crescimento foram descartadas.

Após a confirmação de pureza dos isolados, todas as amostras positivas foram armazenadas em caldo BHI com glicerol a 20% em estoque congelado de - 20°C e - 80°C até o uso. A obtenção dos isolados foi autorizada pelo Comitê de Ética em pesquisa, estando registrada no CAAE: 09232219.9.0000.5208.

3.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados epidemiológicos foram disponibilizados pelos laboratórios dos hospitais parceiros, sem que a equipe tivesse contato direto com os pacientes e prontuários.

Foram coletadas informações sobre: tipo de amostra, data da coleta, setor em que o paciente se encontrava e perfil fenotípico de resistência bacteriana.

3.3 REATIVAÇÃO E REIDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Após armazenamento em estoque congelado, as espécies bacterianas foram reativadas em caldo BHI e incubadas de 24 – 48 h em estufa bacteriológica a 37 °C e, posteriormente, semeadas em placas de BHI Agar, a fim de serem reidentificadas através de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) (BRUKER), em parceria com o Laboratório de Multiusuários de Nanotecnologia – LMNANO/CETENE – Recife.

Para preparação da placa de leitura do Maldi TOF/TOF, as amostras foram inoculadas, em duplicata, com auxílio de ponteiras de 200 µL e adicionados 1 µL de ácido Fórmico 70% e 1 µL de matriz α-cyano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrilo e 2,5% de ácido trifluoracético – TFA; em outro poço foi pipetado 1 µL de matriz α-cyano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrilo e 2,5% de TFA juntamente com 1 µL calibrante para peptídeos de baixo peso molecular (Protein 1

CalibStandard - Bruker Daltonics) contendo seis peptídeos e deixando a placa secar completamente em temperatura ambiente.

Para a obtenção dos espectros referentes às proteínas ribossomais bacterianas, configurou-se o equipamento utilizando o método MBT_FC.par e Geometria MTP 384 ground steel. O aparelho foi considerado calibrado após a identificação de no mínimo quatro dos seis peptídeos do calibrante. A obtenção dos espectros foi realizada utilizando potência do laser em 50 a 60%, tendo a incidência mínima de 1800 e máxima de 2400 (m/Δm) para identificação bacteriana.

A leitura e identificação dos espectros foram realizadas pelo software Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Os isolados identificados como *Acinetobacter* spp. foram testados quanto a presença do gene *bla*_{OXA51}, conforme descrito no item 4.6, os isolados positivos foram identificados como pertencendo a espécie *Acinetobacter baumannii* os isolados que não amplificaram o gene foram considerados *Acinetobacter* spp.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

3.4.1 Preparo das placas

Os inóculos bacterianos foram preparados, utilizando-se o método de suspensão direta de microrganismos em salina estéril; para tanto, utilizou-se isolados bacterianos reativados em 1mL de caldo BHI com crescimento de 12-24h em estufa bacteriologia a 37°C.

Os isolados foram transferidos para tubo contendo salina estéril e ajustados de acordo com a escala McFarlad no padrão de turbidez de 0,5, correspondendo a aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL, de acordo com a CLSI – 2018 (PATEL et al., 2017) e EUCAST (2017), obedecendo-se o tempo de utilização dos inóculos recomendado de 30 min. após o preparo; os inóculos que ultrapassaram o período recomendado foram descartados.

Nas placas de 96 poços foi adicionado caldo *Mueller Hinton* cátion ajustado, utilizando os antimicrobianos Meropenem, Polimixina B e Colistina. As variações de concentrações utilizadas foram obtidas por diluição seriada, usando o padrão de

concentrações recomendado para cada antimicrobiano, conforme preconizado pela CLSI – 2018 (PATEL et al., 2017) (Tabela 2).

Foram utilizados como controles:

- A) Controle positivo dos isolados: um poço semeado apenas com meio de cultura sem antimicrobiano;
- B) Controle negativo do meio: um poço contendo apenas o meio utilizado;
- C) Controle negativo do antimicrobiano: um poço contendo meio de cultura acrescido do antimicrobiano testado, sem adição de isolado bacteriano.

Após o preparo das placas, foi acrescentado 1µL do inóculo em cada poço, todos os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

Tabela 2: Relação dos antimicrobianos utilizados na obtenção do CIM, diluições utilizadas e valores de resistência e sensibilidade estabelecidos pelo CLSI.

	Variações de concentrações utilizadas em µg/ml	CIM		
		S	I	R
Meropenem	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128	≤2	4	≥8
Colistina	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	≤2	-	≥4
Polimixina B	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32	≤2	-	≥4

Fonte: CLSI – 2018 (PATEL et al., 2017).

S- sensível, I- Resistência intermediária, R – Resistente.

3.4.2 Leitura das placas e determinação do CIM

A determinação do CIM foi realizada após incubação da placa em estufa bacteriológica a 37°C por 18 h. As concentrações inibitórias foram determinadas por observação direta do crescimento bacteriano, considerando-se como crescimento positivo, poços que apresentaram turbidez em relação aos controles negativos.

Foi considerada como CIM a primeira concentração em que o isolado não apresentou crescimento. A determinação de resistência frente aos antimicrobianos foi realizada de acordo com as concentrações estabelecidas pelo CLSI – 2018 (Tabela 2), sendo considerados apenas os resultados quando eles apresentavam crescimento igual em pelo menos 2 das 3 réplicas do mesmo isolado.

3.5 CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

A classificação do perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos foi realizada utilizando a classificação preconizada pela ANVISA (2015). Foram considerados MDR os isolados que apresentaram o fenótipo MDR, com resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas e resistência extensiva aos antimicrobianos (XDR); os isolados que apresentarem ausência de resistência a no máximo duas categorias de antimicrobianos.

A análise foi realizada utilizando os dados de resistência obtidos nos laboratórios dos hospitais através de teste de disco difusão juntamente com o perfil de susceptibilidade a Polimixina B e Colistina, realizado no laboratório de pesquisa através da técnica de microdiluição em caldo.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Para extração do DNA total, utilizou-se o método de Sambrook e colaboradores (2001). Os isolados bacterianos foram cultivados em tubos contendo 1 mL de meio BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 18 h. Após o crescimento, o conteúdo do tubo foi transferido para microtubos de 1.5 mL e centrifugados durante 5 min. a 4.200 g, para separar as células bacterianas do meio de cultura.

As células foram ressuspensas em 500 µL de TE 10:1 e centrifugadas por 5 min. a 1.200 g para remoção do meio de cultura. Após remoção do sobrenadante, as bactérias foram ressuspensas em 500 µL de TE 10:1 acrescido de 10 µL de Proteinase K a 5 mg/mL; a solução foi incubada a 60 °C por 20 min., após a finalização do tempo, adicionou-se 100 µL de STE (pH 8.0), seguido de incubação a 60 °C por 15 min. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 min. e posteriormente incubadas no gelo por 5 min.; ao término do tempo foi acrescentado 130 µL de acetato de amônio (7,5 M) e incubou-se no gelo por 15 min. Ao final da incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 min. e o sobrenadante (aproximadamente 700 µL) foi transferido para outro microtubo, adicionando-se o mesmo volume de fenol – clorofórmio – álcool isoamílico e centrifugou-se a 12.000 g por 5 min.

A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescentou-se 420 µL de álcool isopropílico, incubando-se a solução a – 20°C por 2h ou – 80°C por 30 min. Após este tempo, centrifugou-se a solução por 10 min. a 12.000 g, retirou-se a fase líquida, preservando-se o *pellet*, que foi ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q e estocado a – 80°C.

3.7 OBTENÇÃO DO PERFIL CLONAL

A análise do perfil clonal dos isolados foi realizada pela técnica de ERIC-PCR em Termociclador (Biometra), utilizando os primers: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (DUAN et al., 2009). A reação de PCR foi realizada com duração de 40 ciclos divididos em três etapas, sendo estas: desnaturação, ocorrendo a 94°C por 1 segundo; de anelamento, a 36° C por 10 segundos; e extensão, por 35 segundos a 72°C, sendo seguidas por uma extensão final a 72°C durante 4 minutos (CABRAL et al., 2012). Para este procedimento, as amostras foram preparadas obtendo-se um volume total de 25 µL, contendo 2,5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,3 µM de cada primer, 10 µL da amostra de DNA a 20 ng/µL e 1,5 U Platinum® Taq, segundo as instruções do fabricante.

3.8 ANÁLISE DOS AMPLICONS

Para análise dos amplicons, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão de TBE 0.5X, com tensão de 60 V e 190 mA durante 3 horas. O gel foi corado com brometo de etídio a 10 mg/mL. O padrão de migração dos amplicons obtidos após a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foi realizado comparando-os com marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) observado com auxílio de transiluminador em Luz UV. O registro fotográfico foi realizado utilizando sistema de fotodocumentação Kodak.

A leitura do gel foi realizada através do programa CLQS versão 1.4.097 da TotalLab; para tanto utilizou-se a configuração *1D Gel/Western Blot analysis*. A elaboração do dendrograma foi realizada pelo mesmo programa, utilizando-se como parâmetros o coeficiente de similaridade de DICE e os dados gerados segundo o método de Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean-UPGMA.

Para definição dos *clusters* utilizou-se como corte similaridade igual ou superior a 80%, considerando-se clones os isolados que apresentaram 100% de similaridade entre si. Os isolados que apresentaram incidência de bandas menor que quatro no gel não foram alocados em *clusters* (TAVAKOL et al., 2018).

3.9 ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

A ocorrência dos genes de virulência *ompA*, *csuE*, *entA*, *piIM* e *bfmS*, bem como dos genes de resistência *bla*_{oxa51like}, *bla*_{oxa23like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{GES}, foi obtida pela técnica de PCR. Para as amplificações, foram utilizados *primers* e condições descritos na tabela 3. Na preparação das soluções para PCR, foi utilizado o Kit Platinum® Taq Polimerase da Invitrogen, segundo as orientações do fabricante. A amplificação foi realizada através do termociclador (Biometra) seguindo as etapas: desnaturação inicial a 96 °C por 5 min., seguida por 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 1 min., 1 min. à temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* descritos na tabela 3, seguidos por 1 minuto em temperatura de 72°C para o anelamento; ao final do último ciclo, as soluções foram submetidas a 10 minutos à temperatura de 72°C para alongamento.

Tabela 3: *primers* utilizados neste estudo e temperaturas de anelamento padronizadas para o uso.

Gene	Primer	Amplicon	Temp. anelamento	Autor
<i>ompA</i>	OmpAF: CGCTTCTGCTGGTGCTGAAT OmpAR: CGTGCACTAGCGTTAGGGTA	531	59°C	TAYABALI et al, 2012
<i>csuE</i>	CsuEF: ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC CsuER:CGACTTGTAACCGTGACCGTATCTTGATA AGGACTTGTAACCGTGACCGTATCTTGATAAG	977	59°C	TURTON et al. 2007
<i>entA</i>	EntAF: CCAACAAGAACGTCACCTT EntAR: ATTCCTGTTTCGGTACTGG	1309	52°C	PENWELL et al., 2012
<i>piIM</i>	PiIM F: TTGGTCACAAGAGA PiIM R: CCCATCGGTCTAGCAA	130	60°C	Este estudo
<i>bfmS</i>	bfmS F: ACCGCCCCGTAATCCGAAC bfmS R: TGAACCTATTCCACCGCCTTTA	127	58°C	Luo et al., 2015
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-DIA-F: CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG VIM-DIA-R: AGGTGGGCCATTACAGCCAGA	523	62°C	FANG et al., 2008
<i>bla</i> _{OXA51LIKE}	OXA-51-like F: TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG OXA-51-like R: TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	58°C	WOODFO RD et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA23LIKE}	OXA-23-like F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501	58°C	WOODFO

	OXA-23-like R: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT			RD et al., 2006
<i>bla</i> _{IMP}	IMPF: GGA ATA GAG TGG CTT AAT TCT C	361	60°C	ELLINGTON N et al., 2007
	IMPR: GTG ATG CGT CYC CAA YTT CAC T			
<i>bla</i> _{GES}	GESF: ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	864	56°C	POIREL et al., 2000
	GESR: CTA TTT GTC CGT GCT CAG G			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC1 extF: GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC	989	66°C	SMITH MOLAND et al., 2003 LI et al., 2015
	KPC1 extR: ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC			
	KPC-RT 1 intF: AAT ACA GTG ATA ACG CCG CC	107	66°C	
	KPC-RT 1 intR: ATT TTT CCG AGA TGG GTG AC			
<i>bla</i> _{NDM}	ndm1F: CTG AGC ACC GCA TTA GCC	754	64°C	PFEIFER et al., 2011
	ndm1R: GGG CCG TAT GAG TGA TTG C			
<i>pmrB</i>	pmrB_F-ext: AAA TCG TGA ATG GGC AAT CT	1914	52°C	GIRARDELL et al., 2016 BECEIRO et al., 2011
	pmrB_R-ext: CTG CCC TTG GAA TAT GGT TC			
	pmrB2-F-int: CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC	549	52°C	
	pmrB2-R-int: CCT AAA TCG ATT TCT TTT TG			

Fonte: Autores destacados na quinta coluna.

Os produtos das PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, tamponados com TBE 0,5 X, submetidos à tensão de 100 V, corrente de 50 mA e tampão BlueGreen Loading Dye (LGC Biotechnology), durante 30 min. O padrão de migração dos amplicons obtidos após as PCRs foram realizados comparando-os com marcador de peso molecular de 100 pb, observados com auxílio de transiluminador e registrados por sistema de fotodocumentação Kodak.

3.10 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES EM *PMRB*

Para avaliação das mutações em *pmrB*, foi amplificado o gene completo, os amplicons foram purificados utilizando o kit PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante; o sequenciamento foi realizado utilizando *primers* internos e externos (tabela 3) e as sequências obtidas foram alinhadas com a sequência referência do gene *pmrB* da ATCC 19606, utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise comparativas das sequências dos aminoácidos foi realizada através do programa PROVEAN PROTEIN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php), utilizando como referência a sequência da proteína *pmrB* da ATCC 19606, disponível no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 8.3.1, utilizando os testes ANOVA one-way e Qui-quadrado.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

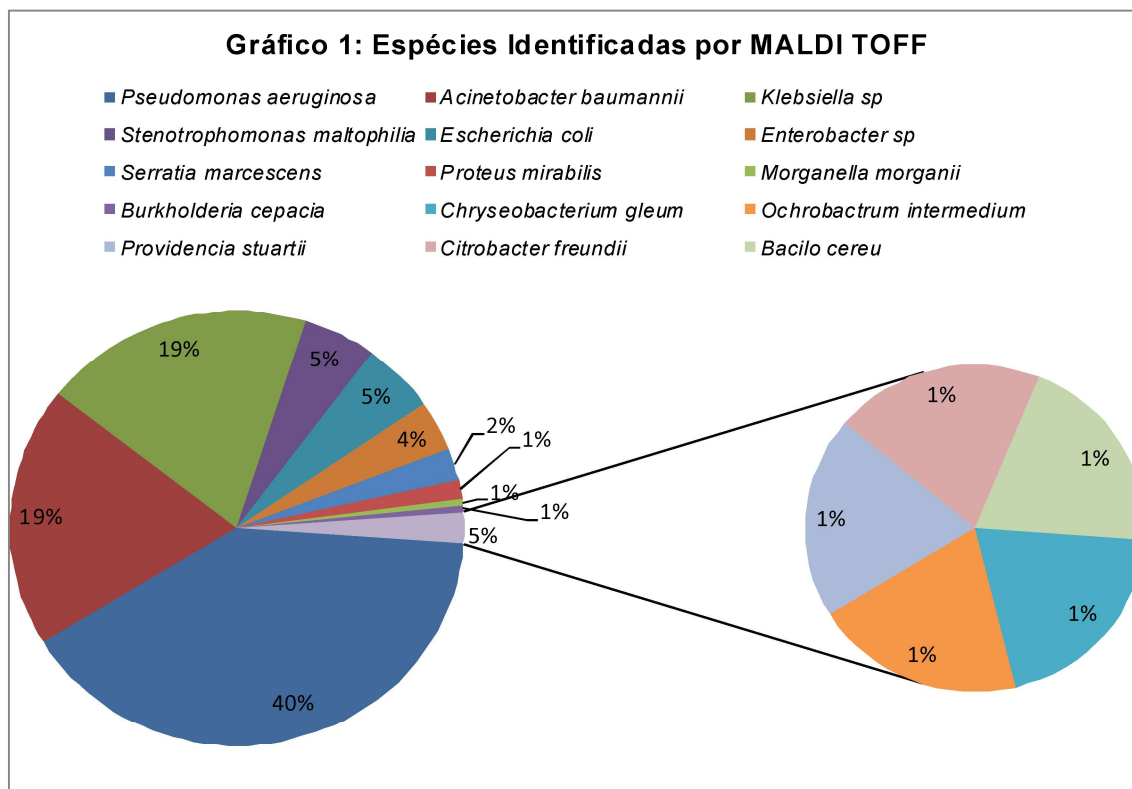
Os isolados coletados para este estudo receberam uma letra inicial para identificação do hospital de origem, seguida de uma sequência numérica sendo utilizadas: A para o hospital público com atendimento de emergência, B para o hospital público sem atendimento de emergência e C para o hospital privado com atendimento ambulatorial.

Foram coletadas 246 amostras, todas com perfil MDR identificados nos laboratórios dos hospitais, sendo 44,30% (109/246) provenientes do hospital A, 11,78% (29/246) do hospital B e 43,90% (108/246) do hospital C.

Das 246 amostras coletadas, 2,84% (7/246) apresentaram heterogeneidade no semeio em EMB e foram reisoladas, e subdivididas em A e B. Os isolados que não apresentaram crescimento após o semeio em caldo BHI e EMB ágar, 6,09% (15/246) foram descartadas do estudo. Desta forma, o total de isolados viáveis coletados foi de 238.

Dos isolados viáveis, 21,84% (52/238) foram identificados como sendo pertencentes ao complexo ABC pelos laboratórios dos hospitais parceiros, sendo 55,76% (29/52) provenientes do hospital A, 19,23% (10/52) do hospital B e 25% (13/52) do hospital C.

Todas as amostras foram reidentificadas através de espectrometria de massa, sendo descartadas do estudo as amostras que não obtiveram score mínimo de 1,90 (2/238). Desta forma, obteve-se um total de 15 espécies identificadas (Gráfico 1), sendo *Pseudomonas aeruginosa* a espécie com maior frequência, 40,09% (85/238), seguida por *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella* spp. correspondendo a 17,2% (41/238) cada uma.



Fonte: Este estudo.

Os dados fornecidos pelos hospitais referentes às amostras apresentam algumas lacunas, constando as informações de origem das amostras: 100% (40/40), setor onde o paciente encontrava-se: 62,50% (25/40) e perfil de resistência aos antimicrobianos: 65% (26/40) (Tabela 4).

Tabela 4: Dados das amostras disponibilizados pelos hospitais

Amostra	Origem da amostra	Setor	Antimicrobianos Resistentes
A02	Sangue	NI	CIP LEV AMI CAZ ATM IPM MPM ERT
A03	LCR	UTI pediátrica	CIP LEV AMI GEN AMP CPM IPM MPM ERT
A08	LCR	UTI pediátrica	CIP LEV GEN AMP CPM IPM MPM ERT
A09	Sec traq	UTI geral	CIP LEV AMI CPM IPM MPM ERT
A12	Sec traq	Área vermelha	CIP LEV AMI CPM IPM MPM ERT
A13	Urina	Enfermaria	CIP LEV NOR AMP CPM IPM MPM ERT
A27	Sec traq	UTI	CIP AMI AMP PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
A28	Urina	Enfermaria	CIP LEV NOR AMI CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
A32	Sangue	Área amarela	NI
A33	Urina	Área amarela	AMI CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
A39	Urina	Urgência	AMI GEN PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
A42	Sec traq	UDT	LEV AMI GEN PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
A50	Sangue	NI	NI
A52	Cateter	NI	NI
A57	Sec traq	NI	NI

A66	Sec traq	NI	NI
A69	Asp traq	NI	LEV AMP CPM IPM MPM ERT
A72	Asp traq	UTI	CPM ATM IPM MPM ERT
A77	Cateter	NI	LEV AMI AMP CPM ATM IMP MPM ERT
A81	Sangue	NI	LEV AMI AMP IPM MPM ERT
A83	Sangue	NI	LEV AMI GEN AMP CPM IPM MPM ERT
A87	Sangue	NI	NI
A92A	Urina	Ala verde	NI
B01	Sec ferida	NI	LEV AMI PPT CPM IPM MPM ERT
B02	Sec ferida	NI	CIP AMI AMP COM IPM MPM ERT
B06	Urina	NI	CIP LEV AMI GEN PPT CPM IPM MPM ERT
B11	Sec traq	UTI	CIP AMI GEN AMP PPT ATM IPM MPM ERT
B18	Sec ferida	NI	LEV AMP PPT CPM ATM IPM MPM ERT
B20	Sec traq	NI	NI
C13B	Sec traq	UTI card	CIP AMI GEN NOR PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
C14	Urina	UTI card	CIP NOR AMI GEN PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
C26	Urina	UTI neuro	CIP AMI PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
C32	Sec traq	UTI neuro	CIP AMI PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT
C41	Sangue	UTI neuro	CIP AMI PPT CAZ CPM ATM IPM MPM ERT POL
C41	Sangue	UTI neuro	NI
C47	Sec traq	UTI geral	NI
C53	Sec traq	UTI neuro	NI
C65	Sec traq	Enfermaria	NI
C67	Sec ferida	Enfermaria	NI
C72A	Cateter	UTI cardio	NI
C80	Sec traq	Enfermaria	CIP NOR LEV AMI GEN AMC CAZ CPM ATM IMP ERT

Fonte: Hospitais parceiros.

CIP= Ciprofloxacina LEV= Levofloxacina NOR= Norfloxacina AMI= Amicacina GEN= Gentamicina AMP= Ampicilina AMC= Amoxicilina + ácido clavulânico PPT= Piperacilina + tazobactam CAZ= Ceftazidima CPM= Cefepime/ ATM= Aztreonam/ IPM= Imipenem/ MPM= Meropenem ERT= Ertapenem POL= Polimixina B COL= Colistina NI= Não Informado UTI= Unidade de Tratamento Intensivo UDT= Unidade de Dor Torácica card= Cardíaca neuro= Neurológica LCR= Líquido Encefalo Raquidiano Sec= Secreção traq= Traqueal Asp= Aspirado

Dos 41 isolados identificados como *Acinetobacter* através de MALDI TOFF, todos apresentaram espectros compatíveis com *Acinetobacter baumannii*, entretanto 17,07% (7/40) foram negativos para a presença de OXA-51 e 1 isolado (2,43%) apresentou inviabilidade para testes moleculares.

Observou-se que a maior frequência dos isolados de *A. baumannii*, 40% (16/40), foram provenientes de aspirado ou secreção traqueal, 20% (8/40) de urina, 17,5% (7/40) de sangue, 10% (4/40) de secreção de ferida, 7,5% (3/40) de ponta de catéter e 5% (2/40) de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) (Tabela 3).

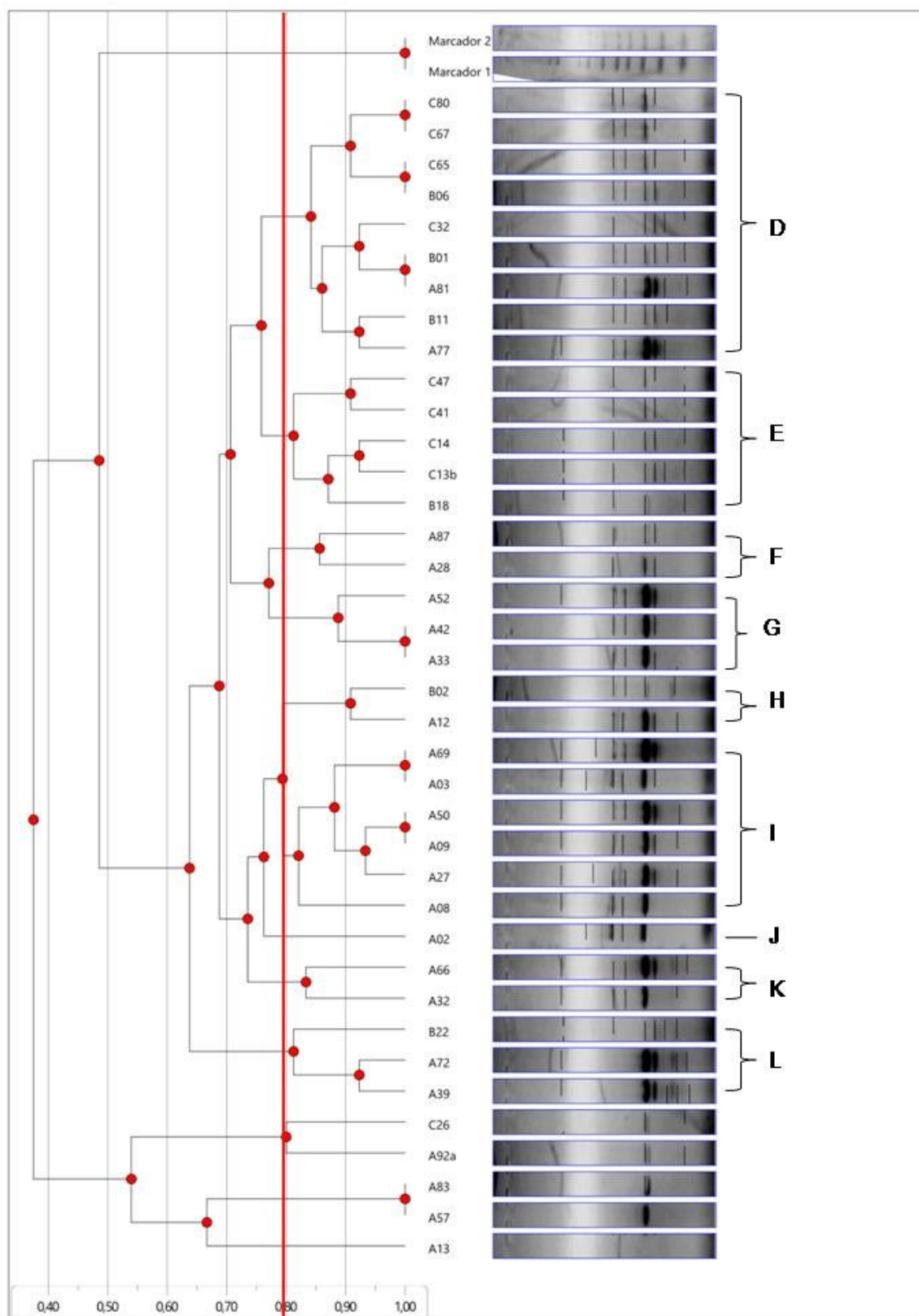
Das 25 amostras de *Acinetobacter* spp. que dispunham da informação de que setor em que os pacientes se encontravam, 56% (14/25) foram provenientes de pacientes de UTIs, 20% (5/25) de enfermaria e 24% (6/25) de outros setores.

De acordo com os dados disponibilizados pelos hospitais, o sítio de infecção mais frequente, 36% (9/25), foi proveniente de amostras de aspirado ou secreção traqueal de pacientes internos em UTIs, 20% (5/25) de amostras de urina de pacientes de setores diversos, 12% (3/25) de amostras de aspirado traqueal de pacientes de setores diversos, 8% (2/25) de amostras de urina e LCR de pacientes internos em UTIs, 4% (1/25) de amostras de catéter e sangue de pacientes de UTIs e 4% (1/25) de amostras de sangue e secreção de ferida de pacientes de outros setores.

4.2 TIPAGEM MOLECULAR

O perfil clonal obtido através de ERIC-PCR apresentou 9 *clusters*, sendo atribuídas a eles as letras de D-L para diferenciá-los (Figura 11).

Figura 11: Perfil clonal obtido através da técnica de ERIC-PCR



Fonte: Este estudo.

O *fingerprinting* obtido através da ERIC-PCR apresenta 6 pares de clones, 3 pertencentes ao *cluster* D, 1 ao *cluster* G e 2 ao *cluster* I. A ocorrência dos clones é observada com maior frequência em isolados provenientes do mesmo hospital, sendo 50% (3/6) decorrentes do hospital A, 16,66% (1/6) do hospital C e 33,33% (2/6) de ocorrência em hospitais diferentes. Observa-se que os isolados provenientes do hospital A apresentam maior distribuição entre os *clusters*, ocorrendo em 7 dos 8 grupos, sendo os *clusters* F, I, K e perfil J, formados exclusivamente por isolados do hospital A (Figura 11).

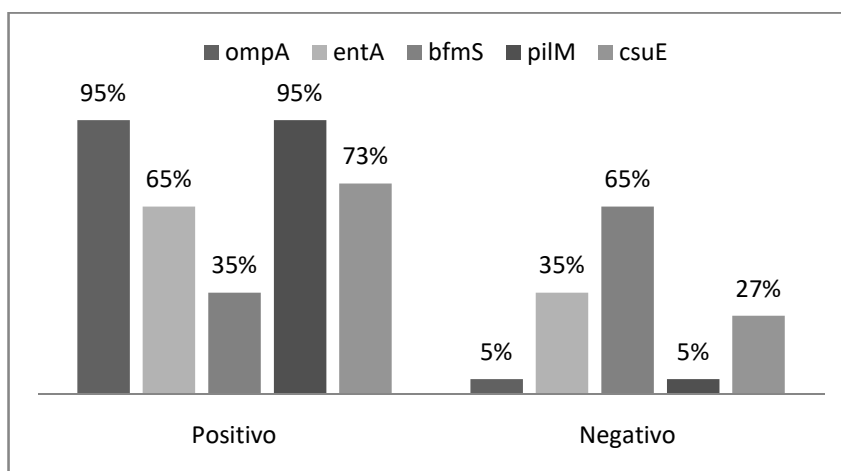
Os isolados obtidos a partir do hospital C apresentam 85% de similaridade, estando agrupados em apenas 2 *clusters* (D e E), com ocorrência de 44,44% (4/9) no *cluster* D e 80% (4/5) no *cluster* E (Figura 11). O hospital B apresentou alta distribuição de isolados entre os *clusters*, sendo as cepas distribuídas entre os grupos D, E, H e L. Observa-se que os clones formados por isolados deste hospital são formados com cepas dos hospitais A e C, não tendo sido encontrados clones formados apenas por isolados do hospital B (Figura 11).

4.3 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Observou-se que 30% (12/40) dos isolados abrigaram todos os genes de virulência pesquisados e apenas os isolados A13 e A32, correspondentes a 5% (2/40) do total dos isolados, não foram capazes de amplificar os genes pesquisados.

Dos genes de virulência investigados, *ompA* e *piIM* foram os que apresentaram maior incidência 95% (38/40); o sideróforo *entA* 65% (26/40) e os de formação de biofilme *csuE* e *bfmS* apresentaram ocorrência de 73% (29/40) e 35% (14/40), respectivamente (Gráfico 2).

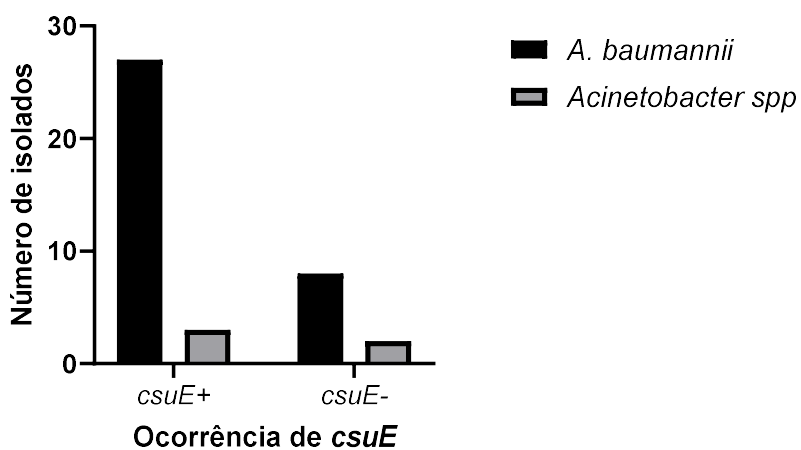
Gráfico 2: Ocorrência dos genes de virulência



Fonte: Este estudo.

Todos os isolados que foram positivos para *bfmS* foram positivos para *csuE*, com a ocorrência em 35% (14/40).

Não foi observada diferença significativa ($p = 0,5835$) entre o potencial de formação de biofilme de isolados de *A. baumannii* e *Acinetobacter* spp. avaliado pela presença de *csuE* (Gráfico 3)

Gráfico 3: Ocorrência de *csuE* em isolados de *A. baumannii* e *Acinetobacter* spp.

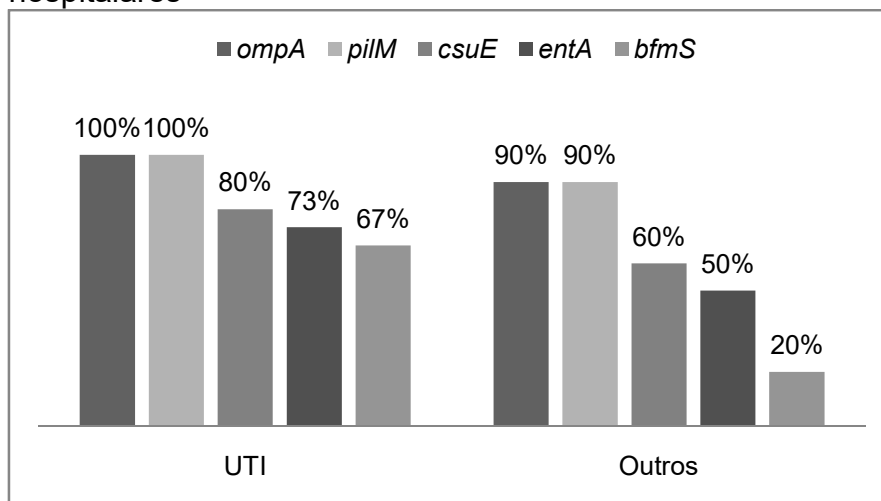
Fonte: Este Estudo

4.4 OCORRÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE SETORES DOS HOSPITAIS

Dos 15 isolados provenientes de pacientes internos em UTIs e UDT, observa-se que a incidência de *ompA* e *pilM* foi de 100% (15/15), 80% (12/15) abrigavam *csuE*, 73,33% (11/15) *entA* e 66,66% (10/15) *bfmS* (Gráfico 4).

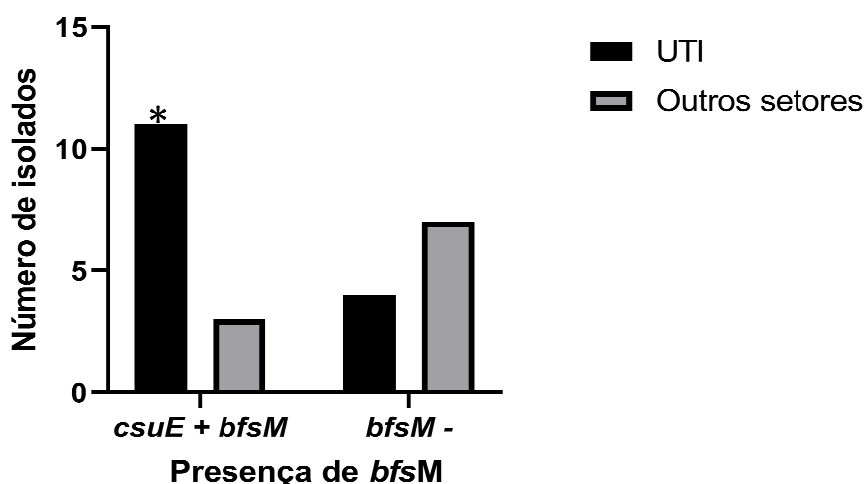
Das amostras coletadas de pacientes de outros setores dos hospitais, *ompA* e *pilM* foram positivos em 90% (9/10), 60% (6/10) para *csuE*, 50% (5/10) para *entA* e 20% (2/10) para *bfmS* (Gráfico 4).

Gráfico 4: Relação entre a ocorrência dos genes de virulência entre os setores hospitalares



Fonte: Este estudo.

A coexistência dos genes formação de biofilme *csuE* e seu promotor *bfmS* apresentou maior ocorrência em pacientes internos em UTIs e UDT 73,33% (10/15), quando comparada a isolados provenientes de outros setores 30% (3/10) (Gráfico 5), tendo a coocorrência dos genes importância significativa ($P= 0,0486$) em isolados provenientes de pacientes de UTIs.

Gráfico 5: Relação entre a coexistência de *csuE* e *bfsM* entre setores dos hospitais.

Fonte: Este estudo

4.5 PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA

A análise do perfil fenotípico de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstrou que 23,07% (6/26) apresentaram o fenótipo MDR e 76,92% (20/26) apresentaram o fenótipo XDR, indicando alto padrão de resistência bacteriana.

O ensaio de microdiluição em caldo (Tabela 5) realizado com os isolados que apresentaram resistência a Meropenem (37/40) demonstrou que todos os isolados testados apresentaram resistência ao antimicrobiano; a maioria dos isolados, 85% (34/40), apresentaram CIM ≥ 128 , maior concentração do fármaco utilizada no ensaio.

Tabela 5: CIMs obtidos para Meropenem, Polimixina B e Colistina

Amostra	MRM		POL		COL	
	CIM	Susc	CIM	Susc	CIM	Susc
A02	>128	R	2	S	2	S
A03	>128	R	2	S	2	S
A08	>128	R	2	S	4	R
A09	128	R	4	R	2	S
A12	128	R	4	R	4	R
A13	64	R	2	S	2	S
A27	64	R	4	R	8	R

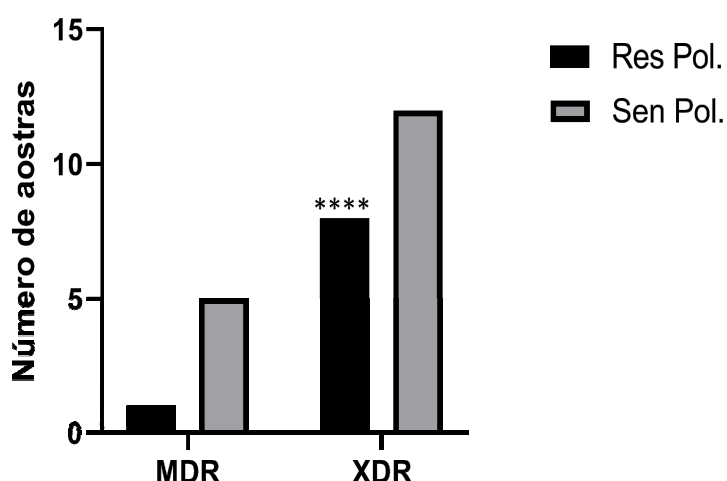
A28	128	R	1	S	1	S
A32	128	R	1	S	2	S
A33	>128	R	4	R	1	S
A39	>64	R	1	S	1	S
A42	>128	R	8	R	4	R
A50	128	R	2	S	1	S
A52	>128	R	2	S	1	S
A57	128	R	2	S	1	S
A66	128	R	1	S	1	S
A69	128	R	1	S	1	S
A72	>128	R	2	S	1	S
A77	128	R	2	S	1	S
A81	>128	R	1	S	0,5	S
A83	>128	R	2	S	0,5	S
A87	128	R	1	S	0,5	S
A92A	-	S	8	R	-	-
B01	>128	R	4	R	2	S
B02	>128	R	2	S	2	S
B06	>128	R	1	S	2	S
B11	>128	R	8	R	1	S
B18	>128	R	0,5	S	0,5	S
B20	>128	R	4	R	4	R
C13B	>128	R	2	S	2	S
C14	>128	R	>16	R	>8	R
C26	>128	R	2	S	1	S
C32	>128	R	2	S	1	S
C41	>128	R	2	S	1	S
C47	>128	R	2	S	1	S
C53	>128	R	2	S	2	S
C65	128	R	2	S	0,5	S
C67	>128	R	>8	R	>8	R
C72A	-	S	>16	R	-	-
C80	-	S	-	-	-	-

Fonte: Este estudo.

MPM= Meropenem, POL= Polimixina B, COL= Colistina

Em relação ao fenótipo de susceptibilidade à Polimixina B e à Colistina, observou-se que 30% (12/40) dos isolados apresentaram resistência à Polimixina B com CIM ≥ 4 , e 17,5% (7/40) foram resistentes à Colistina, sendo 15% (6/40) resistentes a ambos os fármacos (Tabela 5), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Gráfico 6).

Gráfico 6: Perfil de susceptibilidade às polimixinas em isolados MDR e XDR .



Fonte: Este estudo.

Res= Resistente Sen= Sensível Pol= Polimixinas

Dos 26 isolados com perfil fenotípico de resistência determinado, observou-se que 40% (8/20) dos isolados XDR apresentaram resistência a pelo menos uma das polimixinas testadas e 16,66% (1/6) dos isolados MDR apresentaram o mesmo perfil com CIM ≥ 4 µg/ml.

4.6 OCORRÊNCIA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A investigação molecular para ocorrência de Oxacilinas demonstrou que 87,5% (35/40) dos isolados apresentaram o gene *bla*_{OXA51} e 80% (31/40) o gene *bla*_{OXA23} (Tabela 6).

Todos os isolados produtores de Oxacilinas foram resistentes a Ertapenem, entretanto os isolados A92A (OXA-51 OXA-23 e GES positivos), C72A (OXA-23 positivo) e C80 (OXA-51 OXA-23 e GES positivos), correspondendo a 7,5% (3/40), apresentaram sensibilidade a Meropenem (Tabela 6).

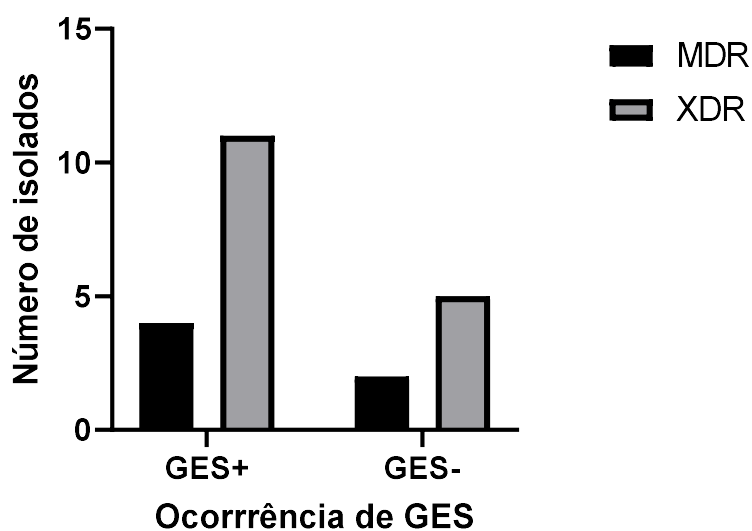
Tabela 6: Ocorrência dos genes de Resistência e Virulência e distribuição dos isolados, de acordo com a tipagem obtida por ERIC PCR.

Amostras	Genes de resistência	Genes de virulência	ERIC-PCR
A02	oxa ₅₁	<i>ompA pilM csuE</i>	J
A03	oxa ₅₁ oxa ₂₃	<i>ompA pilM csuE</i>	I
A08	oxa ₅₁	<i>ompA bfmS pilM csuE</i>	I
A09	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM csuE</i>	I
A27	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM</i>	I
A50	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM</i>	I
A69	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM</i>	I
A12	oxa ₅₁ oxa ₂₃	<i>ompA pilM csuE</i>	H
B02	oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	H
A28	oxa ₅₁	<i>ompA pilM</i>	F
A87	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM csuE</i>	F
A33	oxa ₅₁	<i>ompA pilM csuE</i>	G
A42	oxa ₅₁	<i>ompA entA pilM csuE</i>	G
A52	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM</i>	G
A32	oxa ₂₃		K
A66	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM</i>	K
A39	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM</i>	L
A72	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC VIM GES	<i>ompA entA pilM</i>	L
B20	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	L
A77	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	D
A81	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	D
B01	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	D
B06	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	D
B11	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	D
C32	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	D
C65	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	D
C67	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	D
C80	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	D
B18	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA pilM csuE</i>	E
C13B	oxa ₅₁ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	E
C14	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	E
C41	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC VIM GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	E
C47	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	E
C26	oxa ₅₁ oxa ₂₃ KPC GES	<i>ompA entA bfmS pilM csuE</i>	-
A92a	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM csuE</i>	-
A83	oxa ₅₁	<i>ompA entA pilM csuE</i>	-
A57	oxa ₅₁ oxa ₂₃ GES	<i>ompA pilM</i>	-
A13	-	<i>ompA pilM csuE</i>	-

Fonte: Este estudo.

Entre as carbapenemases da Classe A de Ambler, GES foi a de maior ocorrência, tendo o gene amplificado em 70% (28/40) dos isolados (Tabela 6); tendo a sua ocorrência aumentada em isolados XDR (Gráfico 6), não sendo significativa ($p>0,9999$) a ocorrência de *bla*_{GES} para diferenciação entre isolados MDR e XDR.

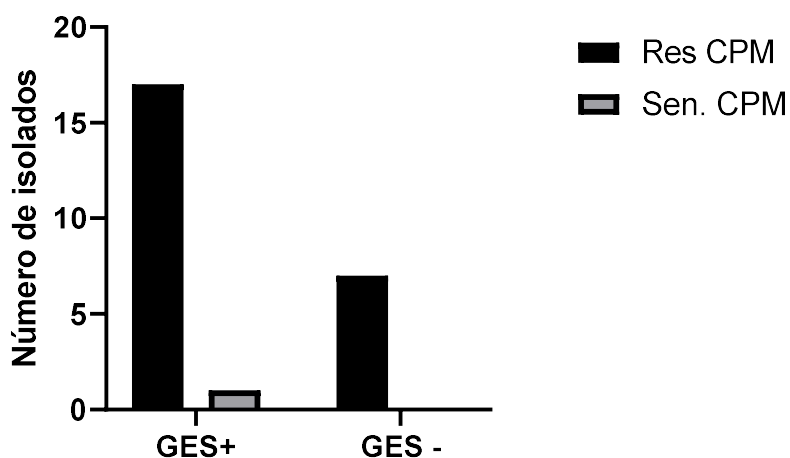
Gráfico 6: Ocorrência de GES entre isolados MDR e XDR.



Fonte: Este estudo

Ademais, não foi observada relação significativa ($p= 0,5443$) entre a ocorrência de GES e a resistência a cefalosporina de quarta geração (Cefepime) (Gráfico 7), como também não foi encontrada relação significativa ($p= 0,6170$) entre a ocorrência do gene e a resistência aos carbapenêmicos (Gráfico 8).

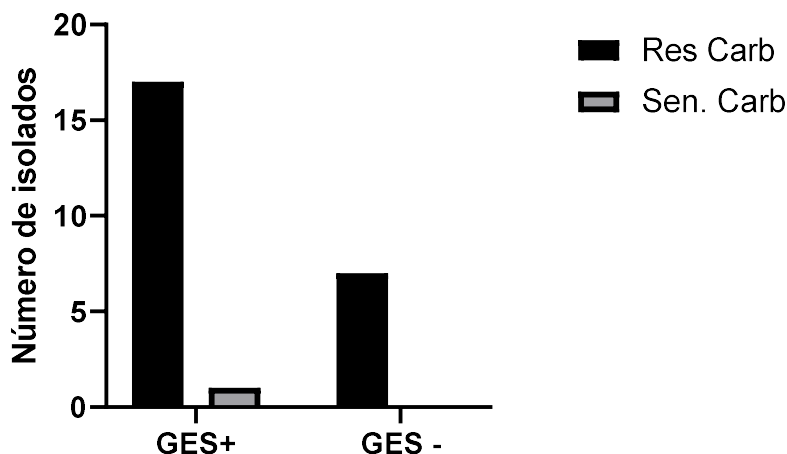
Gráfico 7: Relação de susceptibilidade á Cefepime e ocorrência de GES



Fonte: Este estudo

Res= Resistente Sen= Sencível CPM= Cefepime

Gráfico 8: Relação de susceptibilidade á Carbapenêmicos e ocorrência de GES.



Fonte: Este estudo

Res= Resistente Sem= Sencível Carb.= Carbapenêmicos

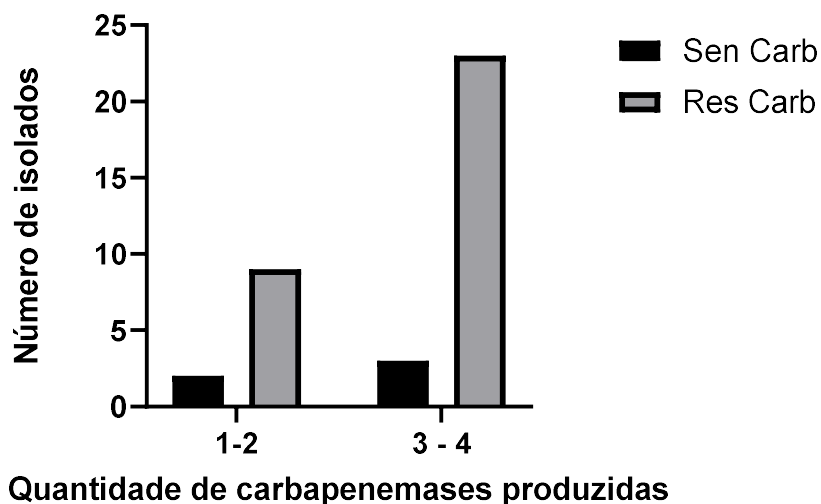
A carbapensemase KPC foi positiva em 12,5% (5/40) dos isolados; todos os isolados que abrigaram gene *bla*_{KPC} abrigavam também *bla*_{GES}. Ademais, observou-se que os isolados que apresentaram coexistência das enzimas KPC e GES apresentaram também resistência a todas as classes de β -lactâmicos testadas.

Com relação às metalo- β -lactamase investigadas, não foram encontrados os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}.

Entretanto, capacidade de produção de VIM foi encontrada em 5% (2/40) dos isolados; ambos abrigando também os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES}, apresentando perfil de resistência a todas as classes de β -lactâmicos testados.

A análise estatística comparativa entre quantidade β -lactamases produzidas pelos isolados e fenótipo de resistência apresentada frente aos carbapenêmicos Meropenem, Ertapenem e Imipenem (Gráfico 9) não foi significativa ($p = 0,6227$).

Gráfico 9: Relação entre ocorrência de β -lactamases produzidas e fenótipo de resistência



Fonte: Este estudo
Res= Resistente Sem= Sencível Carb.= Carbapenêmicos

4.7 RELAÇÃO ENTRE PERFIL CLONAL E OCORRÊNCIA MOLECULAR DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA.

Os *clusters* que apresentam maior número de isolados D, E e H apresentaram maior ocorrência dos genes formadores de biofilme *csuE* e *bfmS*; observou-se que, entretanto, não foi encontrada significância ($p = 0.8676$) relacionada à ocorrência.

Dos isolados que foram positivos para todos os genes de virulência pesquisados ($n=10$), observou-se que 90% (9/10) encontram-se nos *clusters* D e E.

Observa-se que a produção da Oxacilinase OXA-23 foi positiva em 87,5% (7/8) dos *clusters*.

A presença de *bla*_{OXA51} foi encontrada em todos os isolados pertencentes aos *cluster* D, E, F, H, I e J.

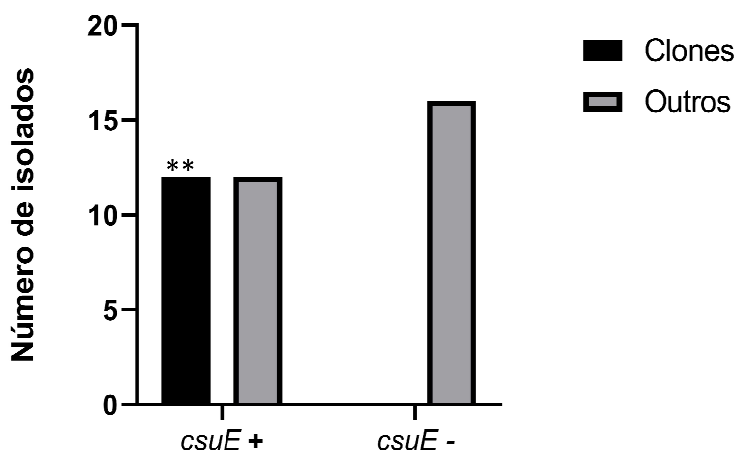
Com relação aos genes de resistência, observou-se que GES apresentou ocorrência de 100% nos isolados dos *Clusters* D, E e L, não estando presente apenas no *cluster* I (Tabela 6).

O gene *bla*_{KPC} apresentou ocorrência em 37,5% (3/8) *clusters* e *bla*_{VIM} em 25% (2/8).

Com relação aos clones, observa-se que todos os isolados foram positivos para os genes de virulência *ompA*, *csuE* e *pilM*. Além disso, a presença de *csuE* foi significativamente aumentada quando comparada a isolados não formadores de

clones ($P= 0,0009$) (Gráfico 10). Verificou-se que período de ocorrência destes isolados foi de poucos dias (A33-A42) a 7 meses (A03-A69), sendo o intervalo médio observado de 3,16 meses (Tabela 7).

Gráfico 10: Ocorrência de *csuE* entre os clones.



Fonte: Este estudo.

Todos os clones formados amplificaram o gene *bla*_{OXA51} e apenas os isolados pertencentes ao clone 4 não abrigaram *bla*_{OXA23}.

A ocorrência de *bla*_{GES} foi de 66,66% (4/6) entre os clones, tendo o clone 5 apresentado 1 isolado negativo para GES e 1 isolado positivo para a produção da enzima (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil de resistência a carbapenêmicos dos clones

	Amostra	Data da coleta	Cluster	Genes de virulência	Genes de resistência a carbapenêmicos	Resistência a Carbapenêmicos
Clone 1	C67	10/2018	D	<i>ompA entA</i> <i>bfmS csuE pilM</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM
	C80	09/2018		<i>ompA entA</i> <i>bfmS csuE pilM</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM
Clone 2	B06	07/2018	D	<i>ompA entA</i> <i>csuE pilM</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM
	C65	09/2018		<i>ompA entA</i> <i>bfmS csuE pilM</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM
Clone 3	B01	06/2018	D	<i>ompA entA</i> <i>csuE pilM</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM
	A81	10/2018		<i>ompA entA</i>	<i>oxa</i> ₅₁ <i>oxa</i> ₂₃ GES	MRM ERT IPM

Clone 4	A33	08/2018	F	<i>csuE pilM</i> <i>ompA csuE</i> <i>pilM</i>	<i>oxa₅₁</i>	MRM ERT IPM
	A42	08/2018		<i>ompA entA</i> <i>csuE pilM</i>	<i>oxa₅₁</i>	MRM ERT IPM
Clone 5	A03	04/2018	H	<i>ompA csuE</i> <i>pilM</i>	<i>oxa₅₁ oxa₂₃</i>	MRM ERT IPM
	A69	11/2018		<i>ompA entA</i> <i>csuE pilM</i>	<i>oxa₅₁ oxa₂₃ GES</i>	MRM ERT IPM
Clone 6	A09	04/2018	H	<i>ompA csuE</i> <i>pilM</i>	<i>oxa₅₁ oxa₂₃ GES</i>	MRM ERT IPM
	A50	09/2018		<i>ompA entA</i> <i>csuE pilM</i>	<i>oxa₅₁ oxa₂₃ GES</i>	MRM ERT IPM

Fonte: Este estudo.

MRM = Meropenem ERT = Ertapenem IMP = Imipenem

4.8 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DECORRENTES DA RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS

Dos 40 isolados de *A. baumannii* analisados, 13 possuíam perfil fenotípico de resistência às polimixinas; observou-se também que houve entre duas a sete mutações nas sequências de nucleotídeos, quando comparadas com a sequência do operon *pmrCAB*, da sequência referência da ATCC 19606. Entretanto todas as mutações encontradas foram identificadas e classificadas como silenciosas, através do programa PROVEAN.

Dos 13 isolados resistentes à Polimixinas, 76,92% (10/13) apresentaram sequências com 100% de identidade nas sequências de *pmrB*, com a presença de 2 mutações nos nucleotídeos 2.793 e 3.031, observando-se alteração de 1 citosina para 1 timina, porém observa-se a conservação dos aminoácidos Leucina e Asparagina, respectivamente (Tabela 8).

Houve 92,30% (12/13) dos isolados que apresentaram alteração no nucleotídeo 2.793 e 84,61% no nucleotídeo 3.031. Observou-se também alteração no nucleotídeo 3.025, com alteração de citosina para timina, com a ocorrência em 23,04% (3/13) dos isolados.

Tabela 8: Análise das mutações em *pmrB* em isolados resistentes às Polimixinas

	Quantidade de Mutações	Local da mutação	Tipo de mutação	Alteração no códon	Aminoácido codificado	Tipo de mutação
A08, A09, A12, A27, A33, B01, B11, B20, C14, C67	2	NC – 2793	C - T	UUU - UUC	Leucina	Silenciosa
		NC - 3031	C - T	AAC – AAU	Aspargina	Silenciosa
		NC – 2793	C - T	UUU - UUC	Leucina	Silenciosa
A42	4	NC – 3025	C - T	CAC - CAU	Histidina	Silenciosa
		NC – 3031	C - T	AAC – AAU	Aspargina	Silenciosa
		NC – 3141	A – C	GCA – GCC	Alanina	Silenciosa
		NC – 2793	C - T	UUU - UUC	Leucina	Silenciosa
		NC – 3025	C - T	CAC - CAU	Histidina	Silenciosa
C72A	5	NC – 3060	C - T	CCC - CCU	Prolina	Silenciosa
		NC – 3093	A - G	AAA – AAG	Lisina	Silenciosa
		NC – 3102	A - G	GCA – GCG	Alanina	Silenciosa
		NC – 2877	C – A	ACC – ACA	Treonina	Silenciosa
		NC – 2934	C – T	AAC – AAU	Isoleucina	Silenciosa
		NC – 2952	T – C	AUU – AUC	Isoleucina	Silenciosa
A92A	7	NC – 2961	G – T	GCG – GCU	Alanina	Silenciosa
		NC – 3025	C - T	CAC - CAU	Histidina	Silenciosa
		NC – 3054	C – T	AGC – AGU	Serina	Silenciosa
		NC – 3063	T – C	CCU – CCC	Serina	Silenciosa

Fonte: Este estudo

A= Adenina T = Timina C = Citosina G = Guanina U = Uracila

NC = Nucleotídeo

5 DISCUSSÃO

Observou-se, entre os isolados coletados, que a segunda maior ocorrência de gêneros de bactérias MDR, foi de *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella* spp., ambas apresentando a mesma proporção. Este fato, diverge dos resultados obtidos por outros estudos que indicam uma baixa incidência de bactérias do complexo ABC em isolados clínicos quando comparados a outras espécies gram-negativas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; SENTRY, 2020).

Dados epidemiológicos disponíveis na plataforma do programa de vigilância antimicrobiana, SENTRY JMI, apontam o complexo ABC como a quinta maior incidência em casos clínicos da América Latina, durante o período de 2013 a 2017, divergindo dos resultados obtidos neste estudo, apontando para um maior destaque na incidência das espécies do complexo ABC em Maceió.

Dentro do complexo ABC, a espécie *A. baumannii* apresentou maior ocorrência, concordando com os dados publicados por diversos autores que indicam que *A. baumannii* apresentando a maior incidência entre as espécies pertencentes ao complexo ABC (ALMASAUDI, 2016; HRENOVIC et al., 2019; COSAGAYA et al., 2019).

Os sítios de coleta mais frequentes, de nosso estudo foram aspirados ou secreções traqueais de pacientes internos em UTIs. Dado similar foi encontrado em estudos anteriores, em que foi encontrada alta ocorrência de infecções, associadas à ventilação mecânica em pacientes internos em UTIs em diversos hospitais (VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019; ALMASAUDI, 2018).

Com relação aos perfis de similaridade obtidos observou-se que os *clusters* apresentaram predominância de isolados de apenas um hospital, sugerindo uma baixa disseminação cruzada entre os hospitais, apontando para uma diversidade genotípica entre os isolados e indicando a inexistência de uma cepa endêmica da região, diferente dos achados de Falah e colaboradores (2019), que apresentaram alta similaridade entre os isolados e presença de dois clones de alta prevalência apontando para uma maior disseminação de cepas bacterianas.

Além do exposto, observa-se uma baixa incidência de clones, sendo estes formados por apenas dois isolados, não correspondem ao padrão indicativo de surto em que observa-se alta incidência de clones com baixo intervalo de tempo entre as coletas. Ademais, observa-se alta similaridade entre os isolados, formando um dendrograma com poucos *clusters* e alta prevalência de clones, não correspondendo ao encontrado neste estudo (BAKHSHI, AFSHARI, FALLAH, 2018).

Com relação aos genes de virulência, os genes *ompA* e *pilM* obtiveram alta prevalência entre os isolados analisados. Além do mais, observa-se uma alta taxa de disseminação destes genes entre os *clusters*. Dados descritos na literatura indicam que esses genes apresentam um importante papel no sucesso das colonizações e infecções causadas por espécies do complexo ABC, apresentando alta ocorrência entre os isolados de *Acinetobacter* spp. (KRZYŚCIAK et al., 2017; EZE, CHEINA, ZOWALATY, 2018; EVANS et al., 2008; NIE et al., 2020).

Com relação à incidência do sideróforo *entA*, estudos anteriores indicam alta ocorrência do gene, podendo chegar a 100% dos isolados em algumas regiões. Em nosso estudo, observou-se uma prevalência significativa deste gene entre os isolados, indicando que a produção de sideróforo é um importante fator para a

sobrevivência bacteriana no meio ambiente e durante as infecções (SHAPIRO, 2017; MORTENSEN, 2013).

Em nosso estudo, observou-se que *csuE* apresentou importância significativa para a ocorrência dos isolados, possibilitando a formação de biofilme, confirmando os achados de outros autores que indicam que 65-80% das infecções humanas são causadas por bactérias produtoras de biofilme (NIE et al., 2020)

Além disso, a coexistência de *bfmS* e *csuE* em pacientes de UTIs foi significativa, indicando um maior potencial de formação de biofilme destes isolados, corroborando com trabalho publicado por Krzyściak e colaboradores (2017), em que os isolados coletados em UTIs apresentam maior potencial de formação de biofilme quando comparados aos coletados em outros ambientes do mesmo hospital.

Ademais, não foi identificada diferença significativa no potencial de produção de biofilme entre isolados de *A. baumannii* e *Acinetobacter* spp., divergindo de estudos anteriores que indicam que a capacidade de formação de biofilme de *A. baumannii* seja três vezes superior as demais espécies do complexo ABC (KRZYŚCIAK et al., 2017; EZE, CHEINA, ZOWALATY, 2018; EL-BADAWY et al., 2019).

Dos isolados que abrigaram todos os genes de virulência pesquisados, observa-se que a maior ocorrência foi em amostras provenientes de pacientes internos em UTIs, indicando um potencial de virulência aumentado nestes isolados. Esse fato se justifica pela maior pressão seletiva causada pelo uso de desinfetantes e antimicrobianos no setor, acarretando na seleção de isolados com maior potencial de virulência como descrito por outros pesquisadores (KRZYŚCIAK et al., 2017; ALMASAUDI, 2018; SATO et al., 2017; ZHOU et al., 2018; EZE, CHEINA, ZOWALATY, 2018).

Observou-se também que, os isolados A13 e A32 não abrigavam os genes pesquisados, sugerindo baixa virulência; entretanto estes isolados não abrigavam *bla*_{OXA51}, indicando que não são pertencentes à espécie *A. baumannii*, corroborando os dados disponíveis na literatura que indicam baixa virulência em espécies de *Acinetobacter* spp., sendo *A. baumannii* a única espécie a apresentar alta virulência (YANG et al., 2019; CHLEBEK et al., 2019).

Observou-se também que todos os clones formados foram identificados como *A. baumannii*, resultado similar ao encontrado por Davandeh e colaboradores (2017), e El-Badawy e colaboradores (2019), em que todos os clones foram

formados por como *A. baumannii*, indicando um maior potencial de disseminação da espécie pertencentes ao complexo ABC, este fato está associado ao maior capacidade adaptativa apresentada pela espécie que permite a bactéria sobreviver por mais tempo no ambiente, ampliando a possibilidade de disseminação (LEE et al., 2013; COSAGAYA et al., 2019; EL-BADAWY et al., 2019; DAVANDEH, ERAÇ, AYDEMIR, 2017; NIE et al., 2020).

Segundo Nie e colaboradores (2020), esta capacidade de permanecer no ambiente está vinculada a formação de biofilme, assim, observou-se que todos os isolados formadores de clones apresentaram os genes *ompA*, *csuE* e *pilM*, indicando um potencial de formação de biofilme como descrito em trabalhos anteriores (LEE et al., 2013; COSAGAYA et al., 2019; EL-BADAWY et al., 2019).

Com relação ao fenótipo de suscetibilidade aos antimicrobianos, alguns autores indicam uma maior prevalência de isolados de *A. baumannii* MDR provenientes de IRAS. Segundo Patil e colaboradores (2019), a prevalência de *A. baumannii* MDR isolados de pacientes de um hospital na China foi de 60% e apenas 20% foram identificados com perfil XDR. Entretanto, em nosso estudo observou-se uma maior prevalência de isolados XDR, corroborando com os achados de El-Badawy e colaboradores (2019), em que 71,1% dos isolados obtidos de pacientes com IRAS em um hospital na Arábia Saudita apresentaram perfil XDR. Esse fato pode ser explicado pela variação regional no perfil de susceptibilidade bacteriana, sendo o perfil de resistência aumentado na América Latina e Oriente Médio, como indicado pela literatura (EL-BADAWY et al., 2019; PATIL et al., 2019; HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018; CHEN et al., 2019).

Todos os isolados com fenótipo MDR ou XDR apresentaram resistência aos carbapenêmicos, que é descrito como sendo uma marca de isolados MDR (WONG et al., 2017; EL-HAFA et al., 2019).

Observa-se que o perfil de resistência aos aminoglicosídeos dos isolados XDR foi aumentado com relação aos MDR, segundo dados epidemiológicos disponíveis na literatura, a resistência a aminoglicosídeos em isolados clínicos de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos varia entre 50 a 100%, correspondendo aos achados neste estudo (WONG et al., 2017; EL-HAFA et al., 2019; EL-BADAWY et al., 2019; ALAMRI et al., 2019).

O número elevado de isolados XDR resistentes a polimixinas encontrado em nosso estudo foi bastante preocupante quando comparado com os dados

disponíveis na literatura, em que apontam para uma resistência entre 0 e 0,8% em isolados MDR e 0 e 22,2% em isolados XDR (WONG et al., 2017; PATEL et al., 2017; LEÃO et al., 2016; EL-BADAWY et al., 2019; SHERRY et al., 2018).

Dados de resistência a Polimixina de isolados do complexo ABC disponíveis no banco de dados SENTRY JMI indicam que a resistência ao fármaco no período de 2016 a 2018 foi de 2,3% em isolados da América Latina. Desta forma, os dados referentes à resistência a polimixinas deste estudo, apresentaram um aumento significativo com relação a epidemiologia disponível (SENTRY, 2020).

Além disto, a alta ocorrência encontrada de *bla*_{oxa23} neste estudo, corresponde com o fato do gene estar amplamente difundido na América Latina, sendo encontrada entre 65,9-100% dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no mundo e 75% nos isolados brasileiros (HRENOVIC et al., 2019; ALAMRI et al., 2019; ABOUELFETOUH et al., 2018; JIANG et al., 2019; FALAH et al., 2019).

Levando em consideração que não foi encontrado na literatura pesquisada relatos da ocorrência do gene *bla*_{GES} em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no Brasil, ressaltamos, em nosso estudo, uma alta ocorrência (70%) de isolados que abrigaram este gene. Ademais, a distribuição deste gene apresenta ocorrência em todos os *clusters* e nos três hospitais pesquisados, sugerindo que essa enzima é uma carbapensemase frequente na região de Maceió, conforme critérios estabelecidos por outras pesquisas (EVAN et al., 2008; ROMNIN et al., 2019; BAKHSHI, AFSHARI, FALAH, 2019).

A coexistência das oxaciclinas com a betalactamase GES sugere um perfil de resistência ampliado, visto que a maior ocorrência foi em isolados que apresentaram fenótipo XDR. Resultado semelhante foi encontrado na África por Hanane e colaboradores (2019), com taxas elevadas de coexistência dos genes.

Observa-se que a resistência a cefalosporinas de quarta geração apresentada pelos isolados produtores de GES observado em nosso estudo corrobora com os dados disponíveis na literatura, que apontam para uma ampliação no espectro de resistência a cefalosporinas conferida por este gene (HANANE et al., 2019; EL-HAFA et al., 2019; AL-AGAMY et al., 2017).

A β -lactamases KPC apresentou ocorrência similar a encontrada por Ribeiro (2016), em São Luiz/MA, em que *bla*_{KPC} foi abrigado por 16,4% dos isolados de *A. baumannii*.

Embora a presença de KPC tenha sido menos frequente quando comparada com enzimas do tipo OXA e GES, todos os isolados que abrigavam *bla*_{KPC} também abrigavam *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA23} e *bla*_{GES}, sendo resistentes a todos os carbapenêmicos testados, corroborando com os achados de Hanane e colaboradores (2019).

Um importante achado foi a incidência da metalo- β -lactamase VIM, não descrita no Brasil em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., apresentando ocorrência em hospitais da rede pública e privada, tendo sido amplificado apenas por isolados de *A. baumannii*. Nas Fontes de pesquisas consultadas não foram encontrados relatos da coexistência de GES, VIM e KPC em isolados clínicos de *A. baumannii* (ABOUELFETOUH; TORKY; ABOULMAGD, 2019; WONG et al., 2017), o que ressalta a importância e ineditismo das contribuições do presente estudo.

Com relação ao perfil fenotípico, os isolados, C41 e A72, produtores de GES, KPC e VIM, apresentaram resistência a todos os β -lactâmicos testados. Desta forma, observou-se resistência a penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, sugerindo uma resistência potencializada conferida pela ampla ocorrência dos genes plasmidiais nestes isolados. De acordo com a literatura, indica uma elevação no potencial de resistência dos isolados que apresentam produção de diversas β -lactamases (EL-HAFA et al., 2019; AL-AGAMY, et al., 2017).

Apenas o isolado C80 apresentou suscetibilidade a meropenem, sugerindo que a presença dos genes codificadores de β -lactamases não são os únicos fatores determinante para a resistência bacteriana, visto que seu clone C67, apresenta o mesmo perfil genotípico e resistência a meropenem (SHAPIRO, 2017).

A análise das sequências de *pmrB* dos isolados resistentes à Polimixina ou à Colistina não apresentaram alterações na estrutura proteica, sugerindo que a resistência ao fármaco não está vinculada a mutações neste gene, divergindo dos achados encontrados por outros autores, em que as mutações encontradas levaram à alteração ou à perda da função proteica (CHIN et al., 2015; KO, CHOI, LEE, 2017; NHU et al, 2016).

A alta incidência de sequências de *pmrB* juntamente com sua distribuição entre os *clusters* sugerem um padrão de ocorrência local, visto que, apesar das alterações na sequência de ácidos nucleicos, a sequência de aminoácidos permanece conservada, não havendo alteração na função (EVANS et al., 2008; BAKHSHI, AFSHARI, FALLAH, 2018).

6 CONCLUSÃO

O perfil clonal obtido aponta para uma baixa disseminação inter e intra-hospitalar, com baixa contaminação cruzada de pacientes e ausência de surtos durante o período do estudo.

Observou-se que alta ocorrência dos genes de virulência entre os isolados com maior prevalência entre os isolados de *A. baumannii*.

A análise do perfil de resistência de isolados de *Acinetobacter* pertencentes ao complexo ABC nos hospitais de Maceió/AL aponta para um perfil de resistência preocupante na capital alagoana. A presença das β -lactamases GES e VIM, descritas pela primeira vez em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. no Brasil, sugere um fenótipo de resistência aumentado, fato que se confirma pela alta incidência de cepas XDR obtidas no estudo.

Além disso, a ocorrência de isolados que abrigam um grande número de genes de virulência pode ser um indicativo de um perfil de virulência aumentada dos isolados, que, juntamente com o alto padrão de resistência encontrado, apontam para uma maior gravidade das infecções causadas pelas bactérias do complexo ABC na capital alagoana.

REFERÊNCIAS

- ABOUELFETOUH, A., TORKY, A. S., ABOULMAGD, E. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Egypt. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 185, 2019.
- ADIBHESAMI, H. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) recovered from burn patients. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 339-348, 2016.
- AGHAJANI, Z., RASOOLI, I., MOUSAVI G., Seyed Latif. Exploitation of two siderophore receptors, BauA and BfnH, for protection against *Acinetobacter baumannii* infection. **Apmis**, 2019.
- AL-AGAMY, M. H. et al. First detection of GES-5 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolate. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 5, p. 556-562, 2017.
- ALJINDAN, R., ALSAMMAN, K., ELHADI, N. ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. **Saudi journal of medicine & medical sciences**, v. 6, n. 1, p. 13, 2018.
- ALAMRI, A. M. et al. Molecular Surveillance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current Microbiology**, p. 1-8, 2019.
- 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.
- ALSAN, M.; KLOMPAS, M.I. *Acinetobacter baumannii*: an emerging and important pathogen. Journal of clinical outcomes management: **JCOM**, v. 17, n. 8, p. 363, 2010.
- AN, Z. et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces HeLa cell autophagy via MAPK/JNK signaling pathway. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 2, p. 97-107, 2019.
- ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano nacional para a prevenção e o controle de resistência microbiana nos serviços de saúde**. 2017.
- ANVISA, NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA No 02/2015
Orientações gerais para a implantação da Sub-rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. 2015.
- ANSARI, H. et al. Study of the immunogenicity of outer membrane protein A (*ompA*) gene from *Acinetobacter baumannii* as DNA vaccine candidate in vivo. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 22, n. 6, p. 669, 2019.
- BAILEY, D. C. et al. Crystal structure of the siderophore binding protein BauB bound to an unusual 2: 1 complex between acinetobactin and ferric iron. **Biochemistry**, v. 57, n. 48, p. 6653-6661, 2018.

- BISWAS, I.; MACHEN, A. METTLACH, J. In Vitro Motility Assays for *Acinetobacter* Species. In: *Acinetobacter baumannii*. **Humana Press**, p. 177-187. New York, NY, 2019.
- BOUVET, P. J. M; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.
- BOUVET, P. J. M.; JEANJEAN, S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. **Research in microbiology**, v. 140, n. 4, p. 291-299, 1989.
- BURNHAM, J. P.; FELDMAN, M. F.; CALIX, J. J. Seasonal Changes in the Prevalence of Antibiotic-Susceptible *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex Isolates Result in Increased Multidrug Resistance Rates During Winter Months. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, p. ofz245. 2019.
- BUSH, K. BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.
- BUSH, K., JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- CABRAL, A. B.; CÁSSIA, R. DE; MELO, D. A.; AMÉLIA, M.; MACIEL, V. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.
- CAMARGO, C. et al. Perfil clonal e fatores de patogenicidade de *Staphylococcus* spp. no **prognóstico das peritonites em diálise peritoneal**. 2012.
- CHEN, R. et al. A1S_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 5, p. e00510, 2017.
- CHIN, C.Y. et al. A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7911-7914, 2015.
- CHLEBEK, J. L. et al. PilT and PilU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili. **bioRxiv**, p. 634048, 2019.
- CIRIONI, O. et al. Colistin enhances therapeutic efficacy of daptomycin or teicoplanin in a murine model of multiresistant *Acinetobacter baumannii* sepsis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 4, p. 392-398, 2016.
- CHAGAS, T. P. G. et al. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil**. Universidade Federal De Pernambuco – Medicina Tropical. Tese de Doutorado. Recife. 2015.

CHEN, Y. et al. Effect of calcium on the interaction of *Acinetobacter baumannii* with human respiratory epithelial cells. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 264, 2019.

CHLEBEK, J.L. et al. PilT and PilU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili. **bioRxiv**, p. 634048, 2019.

CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G.; LYNCH III, J. P. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat. **Current opinion in critical care**, v. 22, n. 5, p. 491-499, 2016.

CONCEIÇÃO-NETO, C. et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 2, p. 282, 2017.

COSGAYA, C. et al. In vitro and in vivo Virulence Potential of the Emergent Species of the *Acinetobacter baumannii* (Ab) Group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2429, 2019.

DAVANDEH, I.; ERAC, B.; AYDEMİR, S. Ş. Investigation of class-d beta-lactamases causing carbapenem resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **Turkish journal of medical sciences**, v. 47, n. 5, p. 1661-1666, 2017.

DE SÁ CAVALCANTI, F. L. et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. e01309-16, 2017.

DOCQUIER, J. D. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 910, 2001.

DOMINGUES, M. M. et al. Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 338-344, 2012.

DUAN, H., CHAI, T., LIU, J. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERICPCR and REP-PCR. **Environ Res.**109:511–517. 2009.

EL-BADAWY, M. F. et al. Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3113, 2019.

EL-HAFA, H. et al. Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the bla_{GES}, bla_{NDM} and bla_{OXA23} in Morocco. **Germes**, v. 9, n. 3, p. 133, 2019.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321-322, 2007.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING et al. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. 2015.

EVANS, B. A. et al. OXA-51-like β -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, n. 3, p. 268-275, 2008.

EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; EL ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 2277, 2018.

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. 2059513119831369, 2019.

FANG, D. et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese medical journal**, v. 121, n. 17, p. 1611-1616, 2008.

FERNANDES, R; AMADOR, P. PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7-17, 2013.

GALLARDO-GODOY, A. et al. Structure-Function Studies of Polymyxin B Liponapeptides. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 553, 2019.

GARNACHO-MONTERO, J. et al. *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 34, n. 9, p. 551-558, 2016.

GIRARDELLO, R. **AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo – UFSP. 2012.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, Mario F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91, 2018.

HASSAN, A. et al. Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 732, 2016.

HRENOVIC, J. et al. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Recovered from Swine Manure. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, p. 725-730, 2019.

- HU, J. et al. Whole-cell biosensing by siderophore-based molecular recognition and localized surface plasmon resonance. **Analytical methods**, v. 11, n. 3, p. 296-302, 2019.
- HRENOVIC, J. et al. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Recovered from Swine Manure. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, p. 725-730, 2019.
- IYER, R. et al. *Acinetobacter baumannii* OmpA is a selective antibiotic permeant porin. **ACS infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 373-381, 2017.
- JONES, C. et al. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 145-154, 2015.
- KETTER, P. et al. Genome sequences of four *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus* complex isolates from combat-related infections sustained in the Middle East. **Genome Announc.**, v. 2, n. 1, p. e00026-14, 2014.
- KIM, S. W. et al. Outer membrane Protein A plays a role in pathogenesis of *Acinetobacter nosocomialis*. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 413-426, 2016.
- KINOSHITA, Y. et al. Study of the structure-activity relationship of polymyxin analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 16, p. 2713-2716, 2018.
- KO, K. S., CHOI, Y., LEE, J. Old drug, new findings: colistin resistance and dependence of *Acinetobacter baumannii*. **Precision and Future Medicine**, v. 1, n. 4, p. 159-167, 2017.
- KRÖGER, C. et al. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 12, 2017.
- KRZYŚCIAK, P. et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. **Apmis**, v. 125, n. 11, p. 1017-1026, 2017.
- KWON, H. II et al. Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* through the OmpA-like domain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3012-3015, 2017.
- KWON, H. I. et al. Distinct role of outer membrane protein A in the intrinsic resistance of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 33-37, 2019.
- LABARCA, J. A. et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 276-292, 2016.
- LE GOFF, J. As doenças têm História, **Terramar**, Lisboa, 1985.
- LEÃO, A. C. Q. et al. *Acinetobacter* spp. are associated with a higher mortality in intensive care patients with bacteremia: a survival analysis. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 386, 2016.

LEE, Y. T. et al. Bacteremic nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*: a single or two distinct clinical entities?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 7, p. 640-645, 2013.

LEITE, G. C. **Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes com avaliação dos mecanismos de resistência**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

LEONG, C. G. et al. The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182139, 2017.

LI, P.; et al. Rapid detection of *Acinetobacter baumannii* and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* in two comprehensive hospitals of Beijing, China. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 997, 2015.

List of the prokaryotic names with standing in nomenclature. LPSN bacterio.net
<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html#r> acessado em 11/12/2019

LI, Y. et al. Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2015.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 119-127, 2014.

LÓPEZ-ROJAS, R.; SMANI, Y.; PACHÓN, J. Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 3, p. 231-233, 2013.

MANDAL, S. M.; PAUL, D. **Bacterial Adaptation to Co-resistance**. Springer, 2020.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MARTINS-SORENSEN, N. et al. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 1, p. 60-64, 2019.

MASCI, D. et al. Switching on the activity of 1, 5-diaryl-pyrrole derivatives against drug-resistant ESKAPE bacteria: Structure-activity relationships and mode of action studies. **European journal of medicinal chemistry**, 2019.

MOFFATT, J. H., HARPER, M., BOYCE, J. D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. **Springer**, Cham p. 55-71, 2019.

- MORTENSEN, B. L.; SKAAR, E. P. The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 95, 2013.
- MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.
- NHU, N. T. K. et al. The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. **Scientific reports**, v. 6, p. 28291, 2016.
- PAKHARUKOVA, N. et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. 5558-5563, 2018.
- PARRA-MILLÁN, R. et al. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and in vivo efficacy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3405-3412, 2018.
- PASCAL, T. A. et al. Experimental Validation of the Predicted Binding Site of Escherichia coli K1 Outer Membrane Protein A to Human Brain Microvascular Endothelial Cells IDENTIFICATION OF CRITICAL MUTATIONS THAT PREVENT E. COLI MENINGITIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37753-37761, 2010.
- PATEL, J. B. et al. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. United State: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, p. 240, 2017.
- PAUL, D. et al. An unusual occurrence of plasmid-mediated *bla*_{OXA-23} carbapenemase in clinical isolates of Escherichia coli from India. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 5, p. 642-645, 2017.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- PENWELL, W. F.; ACTIS, L. A. Isolation and Characterization of the Acinetobactin and Baumannoferrin Siderophores Produced by *Acinetobacter baumannii*. In: *Acinetobacter baumannii*. **Humana Press**, New York, NY, p. 259-270. 2019.
- PENWELL, W. F.; ARIVETT, B. A.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* entA gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36493, 2012.
- PEREIRA, D. C. R. et al. **Caracterização da resistência de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos e desinfetante hospitalar. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz/RJ 2013.
- PFEIFER, Y. et al. Molecular characterization of bla NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1998-2001, 2011.

- PIEPENBRINK, K. H. et al. Structural diversity in the type IV pili of multidrug-resistant *Acinetobacter*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 44, p. 22924-22935, 2016.
- POIREL, L. et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 622-632, 2000.
- POLOTTO, M. **Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos e tipagem molecular de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes internados em unidades de terapia intensiva de um hospital terciário**. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto. 2014.
- RIBEIRO, P. C. S. et al. Phenotypic and molecular detection of the *bla*_{KPC} gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in Sao Luis, MA, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 737, 2016
- ROCA S. I. et al. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 148, 2012.
- ROCHA, L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 6, p. 358-361, 2017.
- ROSSAU, R. et al. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 310-319, 1991.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Volume 3. Third Editionth edition. 2001.
- SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 31-37, 2016.
- SÁNCHEZ-ENCINALES, V. et al. Overproduction of outer membrane protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 6, p. 966-974, 2017.
- SATO, Y.; et al. Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 2, p. 203-212, 2017.
- SMITH MOLAND, E. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711-714, 2003.

- SHAPIRO, J. A.; WENCEWICZ, T. A. Structure–function studies of acinetobactin analogs. **Metalomics**, v. 9, n. 5, p. 463-470, 2017.
- SILVA JÚNIOR, V. V. et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-11} in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764-768, 2017.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V., SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. *International journal of systematic bacteriology*, v. 30, n. 1, p. 225-230, 1980.
- STEIMLE, A., AUTENRIETH, I. B., FRICK, J. S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 5, p. 290-301, 2016.
- TAN, S. Y.; TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. **Singapore medical journal**, v. 56, n. 7, p. 366, 2015.
- TAVAKOL, M. et al. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 120, 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, 2012.
- TRIMBLE, M. J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.
- TJERNBERG, I.; URSING, J. A. N. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **Apmis**, v. 97, n. 7-12, p. 595-605, 1989.
- TORTORA, G. J., FUNKE B. R., CASE, C. L. *Microbiologia. Artmed*, Ed. 8, Porto Alegre, 2005.
- THUMMEPAK, R. et al. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Int Microbiol**, v. 19, n. 2, p. 121-9, 2016.
- TURTON, J. F. et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and ‘non-hypervirulent’ types ST147, ST15 and ST383. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 1, p. 118-128, 2017.
- VIEIRA, P. B; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev Bras Ciênc Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-6, 2015.
- VELKOV, T., ROBERTS, K. D. Discovery of Novel Polymyxin-Like Antibiotics. In: *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. **Springer**, Cham, p. 343-362, 2019.
- VIJAYAKUMAR, S. et al. Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Frontiers in public health**, v. 4, p. 105, 2016.

VIJAYAKUMAR, S.; BISWAS, I.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. **Future science OA**, v. 5, n. 7, p. FSO395, 2019.

VUOTTO, C.; DONELLI, G. Novel Treatment Strategies for Biofilm-Based Infections. **Drugs**, p. 1-21, 2019.

WANG, X. et al. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-12, 2019.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. β -Lactam Antibiotics. In: Infectious Diseases. **Elsevier**, p. 1203-1216. e2. 2017.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, 2014.

WHO, World Health Organization. **Global action plan on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf>. Acessado em: 10/10/2019.

WHO, World Health Organization. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acessado em: 10/10/2019.

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**, Amsterdam, US, v.27, p. 351-353, 2006.

YANG, C. et al. Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1849, 2019.

ZENG, X., LIN, J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 128, 2013.

ZEIGHAMI, H. et al. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 629, 2019.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; QIAO, L. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. **World journal of emergency medicine**, v. 4, n. 3, p. 169, 2013.

ZHOU, K. et al. An emerging clone (ST457) of *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 with enhanced virulence and increasing endemicity in South China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. suppl_2, p. S179-S188, 2018.

ZHOU, K. et al. An emerging clone (ST457) of *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 with enhanced virulence and increasing endemicity in South China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. suppl_2, p. S179-S188, 2018.