

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

Gabrielle Limeira Genteluci

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO, RESISTÊNCIA A  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE  
*Acinetobacter baumannii* COLETADOS DE DOIS HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA  
DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE 2010 E 2011**

Rio de Janeiro

2016

Gabrielle Limeira Genteluci

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO, RESISTÊNCIA A  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE  
*Acinetobacter baumannii* COLETADOS DE DOIS HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA  
DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE 2010 E 2011**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas  
Karyne Rangel Carvalho

Rio de Janeiro

2016

Gabrielle Limeira Genteluci

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO, RESISTÊNCIA E FATORES DE  
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* COLETADOS DE DOIS  
HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE  
2010 E 2011**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 26/01/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Verônica Viana Vieira (Doutor)  
Fundação Oswaldo Cruz

---

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

---

Alex Guerra Ferreira (Doutor)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

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

---

Karyne Rangel Carvalho (Doutor) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Aos meus pais, Maria Alice Limeira Genteluci e Fernando Luiz Genteluci Martins, por todo o apoio, carinho e suporte dado em toda minha vida. Agradeço a minha família que sempre me incentivou e não mediu esforços para que eu alcançasse essa etapa em minha vida. Ao Paulo Marcos Gonçalves Filho, meu mais que amigo, companheiro, obrigado pelo carinho, pela paciência, apoio e por sua capacidade de me trazer paz em meio a toda essa correria. As amigas que sempre me apoiaram, Ana Carolina Feliciano, Raíza Cabral e Letícia Azevedo por todos esses anos de amizade. Também agradeço às amigas Maria Luiza Cabral, Tamara Lobo, e em especial à Daniela Betzler, por todo apoio recebido durante os momentos difíceis do mestrado, e também, pela compreensão, amizade, pelo companheirismo e carinho de vocês!

Obrigada aos amigos do Setor Saneantes! Agradeço aos membros dessa família: Bruna Sabagh, Célia Romão, Christiane da Silveira, Gessy Fernandes, Felipe Oliveira, Priscila Dias. Esse setor é repleto de companheirismo e apoio, obrigada por manterem este laboratório um ótimo ambiente de trabalho. Vocês são pessoas muito especiais, que levarei para o resto da vida!

Esse agradecimento se estende às minhas orientadoras Dr<sup>a</sup> Maria Helena Villas Bôas e Dr<sup>a</sup> Karyne Rangel, pela paciência na orientação, apoio e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Sou muito grata pelos ensinamentos.

Agradeço também à Dra. Cristina Pessolani, por ceder o laboratório de Hanseníase e o material para os experimentos em cultura de células e ao Dr. Edson dos Santos do Laboratório de Enterovírus, por cederem a linhagem celular testada no experimento em cultura de células.

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

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

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

## RESUMO

*Acinetobacter* spp. tem sido cada vez mais relatado como importante patógeno hospitalar no mundo inteiro. Entre as espécies desse gênero, *A. baumannii* tem se destacado, sendo responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). No Brasil, esse microorganismo é um motivo de preocupação por conta da sua alta prevalência no ambiente hospitalar e multirresistência a antimicrobianos. De acordo com o último relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em 2013, *A. baumannii* foi classificado como o quarto patógeno mais prevalente entre os pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI). Neste estudo, tivemos como objetivos confirmar a identificação de 92 isolados de *A. baumannii* coletados de dois hospitais públicos do Rio de Janeiro, durante um período de um ano, utilizando testes bioquímicos e métodos moleculares. Além disso, caracterizar fenotipicamente e molecularmente a resistência a antimicrobianos, determinar a diversidade genética e avaliar fatores de virulência desses isolados. A análise da sequência do gene *rpoB* foi realizada para confirmar a identificação da espécie *A. baumannii* de todos os isolados. Além disso, em 93,5% (n=86) dos isolados, foi verificado o perfil de multirresistência (MDR). Dentre os isolados MDR, 93% (n=80) foram resistentes aos carbapenemas (imipenem e meropenem) e 80,2% (n=69) foram resistentes a polimixina B, para esse antimicrobiano os isolados apresentaram valores de Concentração Inibitória Mínima entre 4-64 µg/mL. Por PCR, verificamos que todos os isolados estudados possuíam o gene *bla<sub>OXA-51</sub>* e o gene da sequência de inserção *ISAbal1*, 93,5% (n=86) dos isolados apresentaram o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* e não houve detecção dos genes *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>* e *bla<sub>OXA-143</sub>*. Dentre os 12 isolados sensíveis ao imipenem, 41,6% (n=5) apresentaram o gene *bla<sub>OXA-51</sub>*, o *bla<sub>OXA-23</sub>* e o *ISAbal1*. Através da análise do polimorfismo genético desses isolados por PFGE, observamos a presença de 22 clones (A ao U), sendo dois clones prevalentes, o A (30,4%, n=28) e o B (18,5% n=17), que estavam presentes nos dois hospitais estudados. A capacidade dos 92 isolados formar biofilme também foi avaliada, nesse estudo, observamos a produção de biofilme em 79,3% (n=73) dos isolados. Um isolado representativo de cada clone prevalente (A e B) e de quatro clones esporádicos (C, D, E e F) foram selecionados para a avaliação do grau de associação por microscopia óptica às células A-549 e HEP-2. De maneira geral, foi observada maior associação dos isolados às células HEP-2. Após realizarmos o ensaio de contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), podemos sugerir que os isolados de *A. baumannii* são capazes de aderir, mas não invadir as células HEP-2. Por fim, quando avaliamos a viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT), notamos resultados condizentes com os observados pela microscopia óptica. Esse estudo pode auxiliar no monitoramento da resistência, conhecimento da epidemiologia molecular e compreensão da patogenicidade de *A. baumannii*. A partir dos resultados obtidos, medidas de controle podem ser implementadas para proteger e promover a saúde da população.

Palavras-chave: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. PCR. 4. PFGE. 5. Biofilme. 6. Fatores de virulência. 7. Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

*Acinetobacter spp.* has been increasingly reported as important nosocomial pathogen worldwide. Among the species of this genus, *A. baumannii* has excelled like an important opportunistic pathogen, responsible for infections related to health assistance (IRHA). In Brazil, this microorganism is a cause for concern because of their high prevalence in hospitals and multi-resistance to antimicrobials. According to the latest report of the National Health Surveillance Agency (Anvisa), in 2013, *A. baumannii* was ranked as the fourth most prevalent pathogen among intensive care unit's patients (ICU). In this study, our objectives were to confirm the clinical identification of 92 isolates that were collected from two public hospitals in Rio de Janeiro, during a period of one year, for this, we used biochemical and molecular methods. In addition, we characterized phenotypically and molecularly antimicrobials resistance to determine the genetic diversity and to assess virulence factors of these isolates. Sequence analysis of the *rpoB* gene was performed to confirm the identification of all clinical isolates as *A. baumannii*. Furthermore, in 93.5% (n=86) of isolates was checked multidrug resistance (MDR) profile. Among the MDR isolates, 93% (n=80) were resistant to cabapenemas (imipenem and meropenem) and 80.2% (n=69) were resistant to polymyxin B, for this antimicrobial, the isolates exhibited Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values between 4 - 64 µg/mL. By PCR, we verified that all the isolates had *bla*<sub>OXA-51</sub> gene and the insertion sequence gene *ISAbal*, 93.5% (n=86) had the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene and there was no detection of *bla*<sub>OXA-24</sub> genes, *bla*<sub>OXA-58</sub>, and *bla*<sub>OXA-143</sub>. Among the 12 isolates sensitive to imipenem, 51.6% (n=5) had the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene, *bla*<sub>OXA-23</sub> and *ISAbal*. Through the analysis of genetic polymorphism of these isolates by PFGE, we noted the presence of 22 clones (A to U), two prevalent clones, A (30.4%, n=28) and B (18.5%, n=17), that were present in two hospitals studied. The ability of the 92 isolates to form biofilm was also evaluated, in this study, we observed biofilm production by 79.3% (n=73) of isolates. One isolate representative of each clone prevalent (A and B) and four sporadic clones (C, D, E and F) isolates, were selected to evaluate the degree of association, by optical microscopy, to A-549 and HEp-2 cells. In general, when we compared this association, we observed a higher association with HEp-2 cells. After we realized the counting of colony forming units test (CFU), we suggest that the isolates of *A. baumannii* are able to adhere but not invade HEp-2 cells. Finally, when we assessed the cell viability by enzymatic reduction reaction of metiltetrazólio salt (MTT), we notes consistent results with the results observed by optical microscope. This study may assist the monitoring of resistance, knowledge of the molecular epidemiology and understanding of the *A. baumannii* pathogenicity. From these results, we can implement control measures to protect and promote the health of the population.

Keywords: 1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Antimicrobials resistance. 3 PCR. 4. PFGE. 5. Biofilm. 6. Virulence factors. 7. Sanitary Surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama demonstrando o desenvolvimento de um biofilme em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	23
Figura 2	Distribuição em percentagem dos 75 isolados de <i>Acinetobacter</i> coletados do HFSE em relação aos diferentes sítios de coleta.	42
Figura 3	Distribuição em percentagem dos 17 isolados de <i>Acinetobacter</i> coletados do HUGG em relação aos diferentes sítios de coleta.	43
Figura 4	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados dos 92 isolados de <i>A. baumannii</i> .	45
Figura 5	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados resistentes à polimixina B.	46
Figura 6	Dendrograma dos isolados de <i>A. baumannii</i> , construído com o auxílio do Gel Compar II versão 4.0 (Applied Maths).	49
Figura 7	Classificação dos isolados de <i>A. baumannii</i> quanto o tipo de produção de biofilme.	51
Figura 8	Sítio de coleta dos isolados que formaram biofilme forte.	51
Figura 9	Grau de associação dos isolados de <i>A. baumannii</i> às células A-549 após 2 h de infecção.	53
Figura 10	Células A-549 infectadas por 2 h com <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.	54
Figura 11	Células A-549 infectadas por 2 h com <i>A. baumannii</i> fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.	54
Figura 12	Grau de associação dos isolados de <i>A. baumannii</i> às células HEp-2 após 2 h de infecção.	55
Figura 13	Células HEp-2 infectadas por 2 h com <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.	56
Figura 14	Células HEp-2 infectadas por 2 h com <i>A. baumannii</i> fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.	56
Figura 15	Porcentagem de viabilidade celular das células HEp-2 infectadas com a cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 e com os isolados representantes de cada clone testado através do ensaio de avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT).	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classe dos antimicrobianos testados na avaliação da suscetibilidade dos isolados de <i>A. baumannii</i> .	31
Tabela 2	Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> específicos utilizados na amplificação dos genes <i>rpoB</i> , <i>bla<sub>OXA-23</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-24</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-58</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-143</sub></i> e <i>ISAbal1</i> .	34
Tabela 3	Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i> e espécies relacionadas (MURRAY et al, 2010).	43
Tabela 4	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e o número de isolados de <i>A. baumannii</i> incluídos em cada perfil.	46
Tabela 5	Distribuição do sítio de coleta em relação ao perfil clonal dos isolados obtidos por PFGE.	48



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
1.1	BREVE HISTÓRICO	11
1.2	<i>Acinetobacter</i> spp.	12
1.3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	13
1.4	DIVERSIDADE GENÉTICA	13
1.5	PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA	15
1.6	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	16
1.6.1	Mecanismos de resistência associados aos $\beta$ -lactâmicos	17
1.6.2	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	19
1.6.3	Diminuição da expressão de porinas (OMPs)	20
1.6.4	Produção bomba de efluxo	20
1.6.5	Outros mecanismos de resistência	21
1.7	BIOFILME	21
1.7.1	Aderência às células eucarióticas	24
<b>1.8</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	29
3.1	ISOLADOS CLÍNICOS	29
3.2	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	29
3.3	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	29
3.4	PESQUISA DE GENES DE OXACILINASES E SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO	31
3.4.1	Obtenção do ácido desoxirribonucleico genômico	31
3.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.5	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	34
3.5.1	Purificação do produto da PCR	34
3.5.2	Determinação das sequências nucleotídicas	35
3.6	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	36
3.7	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	36

3.8	AVALIAÇÃO DO GRAU DE ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS COM ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i>	37
3.8.1	Cultivo e manutenção de células epiteliais	38
3.8.2	Isolados clínicos	38
3.8.3	Preparo dos isolados de <i>A. baumannii</i>	39
3.8.4	Microscopia óptica	39
3.8.5	Ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)	40
3.8.6	Avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT)	40
3.9	ASPECTOS ÉTICOS	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	42
4.1	DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS	42
4.2	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	43
4.3	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	44
4.4	PESQUISA DE GENES DE OXACILINASES E SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO	47
4.5	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	47
4.6	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	50
4.7	AVALIAÇÃO DO GRAU DE ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS COM ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i>	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	73
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BREVE HISTÓRICO

O microbiologista holandês Beijerinck isolou em 1911, pela primeira vez, micro-organismos do gênero *Acinetobacter* do solo usando o meio mínimo enriquecido com acetato de cálcio. Esse gênero, que originalmente foi descrito como *Micrococcus calco-aceticus*, foi proposto por Brisou e Prevot em 1954, para diferenciar esses micro-organismos daqueles com motilidade dentro do gênero *Achromobacter*. O gênero *Acinetobacter* foi amplamente aceito por volta de 1968 após Baumann e colaboradores publicarem um estudo abrangente sobre organismos como *Micrococcus calco-aceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* e *Bacterium anitratum*. Esse estudo concluiu que esses micro-organismos pertenciam a um único gênero e não podiam ser subclassificados em diferentes espécies com base em características fenotípicas (BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968). Em 1971, a subcomissão responsável pela Taxonomia de *Moraxella* e bactérias associadas, reconheceu oficialmente o gênero *Acinetobacter* com base nos resultados de 1968 (LESSEL, 1971).

Alguns anos depois, a espécie *Acinetobacter baumannii*, previamente denominada *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* (*Herellea vaginicola*), foi descrita por Bouvet e Grimont após ser isolada de pacientes hospitalizados (BOUVET; GRIMONT, 1986). Enquanto na década de 1970 esse micro-organismo era suscetível a maioria dos antimicrobianos, hoje esse patógeno apresenta grande resistência a maioria dos antimicrobianos de primeira linha (FOURNIER et al, 2006, POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Por conta disso tornou-se uma das principais causas de preocupação, principalmente em zonas de conflitos e ganhou especial notoriedade durante a guerra do Iraque, ganhando o apelido de "Iraqibacter". Isso ocorreu, após serem observadas altas incidências de infecções da corrente sanguínea causadas por isolados de *A. baumannii* multirresistentes (MDR) entre os membros do serviço do exército dos Estados Unidos da América (EUA) (CDC, 2004).

Assim, *A. baumannii* tem despertado o interesse da comunidade científica ao longo dos últimos 15 anos, o que tem levado a significativos avanços na compreensão da patogenicidade deste micro-organismo.

## 1.2 O gênero *Acinetobacter*

Micro-organismos do gênero *Acinetobacter*, atualmente são definidos como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios estritos, não fermentadores, não exigentes, não móveis, catalase positivos, oxidase negativos e com um conteúdo de GC em seu DNA entre 39% e 47% (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Em 1986, após realizarem estudos de hibridização DNA-DNA, Bouvet e Grimnot determinaram que o gênero *Acinetobacter* era constituído por 28 espécies com nomes oficialmente reconhecidos, dentre elas: *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. junii* e *A. lowffii*, além de 15 espécies genômicas. Atualmente esse gênero é constituído de 42 espécies (LPSN BACTERIO.NET, 2015), incluindo as quatro espécies do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e as espécies genômicas *Acinetobacter 3* e *Acinetobacter 13TU*, atualmente denominadas, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, respectivamente) (NEMEC, 2011). A espécie *A. calcoaceticus* é ambiental e não tem sido relacionada a doenças clínicas, enquanto as outras três espécies pertencentes ao complexo são, talvez, as espécies mais clinicamente significativas, sendo relacionadas tanto a infecções nosocomiais, como adquiridas na comunidade (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Para identificar os micro-organismos do gênero *Acinetobacter* a nível de espécie, 28 métodos fenotípicos estão disponíveis e mostraram ser 95,6% eficazes na identificação das espécies de *Acinetobacter* derivados de pele humana (SEIFERT et al, 1997). Mesmo assim, ainda há grande dificuldade para distinguir, por características fenotípicas, as espécies que fazem parte do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (GARRITY et al, 2005, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Esses métodos fenotípicos também podem ser ineficazes na identificação de espécies genômicas de *Acinetobacter* descobertas mais recentemente (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Por conta desses motivos, métodos mais avançados de diagnóstico molecular têm sido desenvolvidos para a identificação espécies de *Acinetobacter*, como por exemplo, o sequenciamento do gene *rpoB* (RNA polimerase  $\beta$  – subunidade) (LA SCOLA; RAOULT, 2004) e ribotipagem (GERNER-SMIDT, 1992).

Organismos pertencentes ao gênero *Acinetobacter* são muitas vezes considerados como onipresentes na natureza, uma vez que eles podem ser recuperados a partir de quase toda amostra ambiental, como por exemplo, de solo e água (BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968).

### 1.3 *Acinetobacter baumannii*

Diferente das demais espécies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* possui uma excepcional capacidade de se adaptar às condições desfavoráveis do ambiente hospitalar e também, vêm demonstrando uma alta resistência a antimicrobianos e agentes desinfetantes. Por conta disso, é uma das espécies bacterianas predominantemente isoladas a partir de material biológico de pacientes hospitalizados (JAWAD et al, 1998, HUSNI et al, 1999, SIENIAWSKI et al, 2013).

*A. baumannii* é um patógeno oportunista e tem uma alta incidência entre indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles que passaram por uma prolongada internação hospitalar. É encontrado colonizando pele humana e também pode ser isolado de secreções respiratórias e de orofaringe de indivíduos infectados (SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008). Nos últimos anos, tem sido designado como um patógeno humano, gerando uma preocupação da comunidade médica, por conta de seu extenso espectro de resistência aos antimicrobianos (CERQUEIRA; PELEG, 2011).

Este fenômeno de patógenos MDR tem se tornado um motivo de grande preocupação tanto em infecções nosocomiais quanto nas adquiridas na comunidade (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). De fato, a Organização Mundial de Saúde (OMS) identificou a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes em saúde humana (BASSETTI; GINOCCHIO; MIKULSKA, 2011). *A. baumannii* atualmente está entre os patógenos MDR mais comuns e graves (RICE et al, 2008; GBAGUIDI-HAORE et al, 2013).

### 1.4 DIVERSIDADE GENÉTICA

Para melhorar o entendimento do aumento da resistência a antimicrobianos e a compreensão sobre propagação de *A. baumannii* nos hospitais, é necessário identificar os potenciais reservatórios do organismo e seus modos de transmissão (TOWNER, 2009). Os métodos de tipagem molecular ou genotipagem são necessários para relacionar epidemiologicamente isolados de *Acinetobacter*, essas metodologias se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para a discriminação entre os

isolados. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é um dos métodos mais comuns utilizados para a genotipagem. Por esse método, a similaridade entre os isolados pode ser classificada como: indistinguíveis, quando os isolados possuem similaridade genética de 100%; relacionadas, quando os isolados possuem mais de 80% de similaridade genética; e os isolados com menos que 80% de similaridade genética são classificados como distintos (TENOVER et al, 1995, SINGH et al, 2006, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Além do PFGE, atualmente também são utilizados métodos como: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007, MAGIORAKOS et al, 2012), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (DESCHAGHT et al, 2011), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e outros métodos baseados em sequências de DNA amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como MLST (*Multilocus sequence typing*) (DI POPOLO et al, 2011).

Tanto o PFGE quanto o MLST são os métodos de tipagem molecular mais utilizados para estudar epidemiologicamente isolados de *Acinetobacter*. Porém, quando um surto está disseminado a diferentes regiões geográficas, deve ser utilizado o MLST, pois essa técnica possibilita discriminar melhor espécies que possuem relações genômicas estreitas. O PFGE é utilizado principalmente para comparação dos resultados dentro de um laboratório. Os métodos PFGE e MLST são fáceis de implementar localmente, mas a vigilância nacional ou internacional ainda precisa padronizar melhor essas técnicas (MITSUDA, 2012).

Foi verificado recentemente, através da técnica de PFGE, que três clones de *A. baumannii* predominam em muitos países europeus desde a década de 1990 (ADAMS-HADUCH et al, 2011, LOWINGS et al, 2015). Já foi demonstrada também a propagação de clones epidêmicos de *Acinetobacter* entre o Brasil e a Argentina (GALES et al, 2004). No Brasil, um estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, mostrou a presença de dois clones prevalentes, sendo um deles disseminados em sete hospitais e o outro em cinco hospitais (CARVALHO et al, 2009).

Por MLST é possível evidenciar a expansão global de isolados de *A. baumannii*. Atualmente são descritos dezoito clones espalhados em mais de um continente (KARAH et al, 2012). O clone internacional, IC2, é de longe o mais amplamente disperso, já encontrado em pelo menos 34 países (KARAH et al, 2012). As infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenemas têm aumentado dramaticamente na América Latina. Diferente do panorama mundial, no Brasil, a maioria desses isolados têm sido associados com os complexos clonais CC79/113, CC109 e CC15/104, relatados no Rio de Janeiro e Salvador

(GROSSO et al, 2011, COELHO-SOUZA et al, 2013, MARTINS et al, 2013, CHAGAS et al, 2014).

## 1.5 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

Como um agente patogênico, *A. baumannii* tem tropismo por tecidos úmidos, tais como membranas mucosas ou áreas da pele que são expostas através de acidente ou danos traumáticos. Após a infecção é possível que haja o aparecimento de bolhas hemorrágicas e um processo necrosante seguido de bacteremia, que sem tratamento, pode conduzir a septicemia e morte. Infecções por patógenos como *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, podem contribuir para o agravamento de infecções causadas por *A. baumannii*, já que estes co-patógenos podem causar infecção necrosante e com isso, criar um sítio de entrada para a corrente sanguínea (TURTON et al, 2006a).

Apesar de sua associação com infecções de pele, *A. baumannii* é encontrado raramente como parte da microbiota normal da pele. Um estudo estimou que no máximo 3% da população são colonizados pela bactéria (SEIFERT et al, 1997). Por outro lado, *Acinetobacter* já foi recuperado em 22% dos piolhos de pessoas sem-teto, sugerindo que esse seja outro reservatório potencialmente importante para este patógeno (LA SCOLA; RAOULT, 2004).

Quando *A. baumannii* é isolado de um ambiente hospitalar, principalmente em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), onde os pacientes são doentes crônicos, há uma grande preocupação. Como a maioria destes pacientes está imunocomprometido e passam por um longo período no hospital, eles apresentam alto risco de contraírem infecções por *A. baumannii*. Pacientes que adquirem dispositivos artificiais, como cateteres, suturas, ventiladores mecânicos e aqueles que tenham sido submetidos à diálise ou antibioticoterapia nos últimos 90 dias, também correm o risco de desenvolver infecções por *A. baumannii* (MONTEFOUR et al, 2008).

O trato respiratório e urinário, sangue, líquido pleural, feridas cirúrgicas, pele e os olhos podem ser locais de infecção ou colonização (BAYUGA et al, 2002, GUSTEN; HANSEN; CUNHA, 2002). *A. baumannii* pode representar uma ameaça a pacientes com pneumonia que necessitem de ventilação mecânica, já que esse micro-organismo tem a capacidade de formar biofilmes na superfície do tubo endotraqueal (LORENTE; DEL CASTILLO; RELLO, 2002).

Apesar de uma extensa pesquisa sobre o potencial de virulência deste patógeno emergente, pouco ainda se sabe sobre o seu verdadeiro potencial patogênico ou repertório de fatores de virulência. Enquanto acredita-se que vários fatores podem contribuir para o potencial de virulência de *A. baumannii*, um fator em particular, a proteína OmpA, membro das proteínas da membrana externa (OMPs), contribui significativamente para a doença provocada por esse agente patogênico. A OmpA de *A. baumannii* pode se ligar às células epiteliais e tem como alvo as mitocôndrias do hospedeiro. Essa proteína induz o aumento dessa organela, provocando sua disfunção. Isto é seguido pela liberação do citocromo C, uma proteína heme que leva à formação de apoptossomo e consequentemente a apoptose da célula (CHOI et al, 2008, KIM et al, 2009). OmpA é a proteína de superfície mais abundante no patógeno e também está envolvida na resistência ao sistema complemento e a formação de biofilmes, duas importantes estratégias de sobrevivência ao estresse e potencialmente um dos mais importantes fatores de virulência que ajudam a promover a sobrevivência de bactérias, tanto dentro como fora do hospedeiro (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009). Além disso, OmpA também tem sido associada com a resistência antimicrobiana em bactérias Gram-negativas, em *A. baumannii*, porém, apenas dois estudos demonstraram o envolvimento dessa proteína na permeabilidade da membrana celular a  $\beta$ -lactâmicos (NITZAN; DEUTSCH; PECHATNIKOV, 2002, SUGAWARA; NIKAIDO, 2012, SMANI et al, 2014)

Outras proteínas-chave também foram demonstradas como capazes de contribuir para a virulência de *A. baumannii* como a fosfolipase D e C. Enquanto a fosfolipase D concede resistência aos mecanismos de defesa presentes no soro humano e auxilia na evasão de células epiteliais e na patogênese (JACOBS et al, 2010), a fosfolipase C tem capacidade de aumentar a toxicidade de *A. baumannii* nos epitélios (CAMARENA et al, 2010).

Por fim, a ligação e adesão a superfícies abióticas, como equipamentos médicos e superfícies do ambiente; e bióticas, parecem ser importantes para a patogênese de *A. baumannii*. Sinais ambientais, tais como cátions metálicos, também desempenham um papel importante na formação de biofilmes, já que essas moléculas aumentam a capacidade de *A. baumannii* aderirem a superfícies (GADDY; ACTIS, 2009).

## 1.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS



Nas últimas décadas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro no ambiente hospitalar, tem se observado a emergência de bastonetes Gram-negativos MDR, inclusive *A. baumannii*. Por conta disso, dentre os fatores de virulência encontrados nesse micro-organismo, a multirresistência a antimicrobianos e a capacidade de formar biofilme vem sendo cada vez mais estudadas (HUSNI et al, 1999). Como limitadas opções de tratamento estão disponíveis para infecção, a presença desses micro-organismos em enfermarias cirúrgicas representa um problema significativo (LEMOS et al, 2013).

Isolados de *A. baumannii* podem ser definidos como MDR, se eles forem resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (MARAGAKIS; PERL, 2008), ou definidos como panresistentes (PDR), se forem resistentes a todas as classes de antimicrobianos disponíveis no mercado (FALAGAS; KOLETISI; BLIZIOTIS, 2006). Em alguns isolados de *A. baumannii*, às vezes pode haver co-expressão de múltiplos mecanismos, resultando em resistência total, com exceção, somente, aos carbapenemas, principalmente, imipenem e meropenem (CASTANHEIRA et al, 2008). Por conta do aumento da utilização de carbapenemas no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, têm sido observados índices crescentes de resistência a essas drogas através de alguns mecanismos.

Na década de 1990, com a emergência de isolados de *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas (MDR), o uso de polimixinas foi reestabelecido, especialmente no caso de isolados resistentes aos carbapenêmicos. As polimixinas são antimicrobianos peptídeos cíclicos carregados positivamente que interagem com a porção de lipídeos A dos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, levando a desorganização e ruptura dessa membrana e permitindo a passagem do antimicrobiano através dela (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). Por outro lado, essa classe de antimicrobianos apresenta graves efeitos adversos, sendo os principais, nefrotoxicidade (principalmente insuficiência renal aguda) e neurotoxicidade. Outros efeitos também são descritos, como por exemplo, alergias, febre e eosinofilia (MENDES; BURDMANN, 2009). No geral, a resistência às polimixinas ainda é rara entre micro-organismos Gram negativos não fermentadores. Atualmente, as polimixinas têm sido consideradas a única opção para o tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* MDR (YOUNG et al, 1992, LEVIN et al, 1999, APPLEMAN et al, 2000, POGUE; COHEN; MARCHAIM, 2015).

### 1.6.1 Mecanismos de resistência associados aos $\beta$ -lactâmicos

Dentre os mecanismos associados à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, podemos citar:  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs; classe A de Ambler), metalo- $\beta$ -lactamases (classe B de Ambler), AmpC  $\beta$ -lactamases (classe C de Ambler) e oxacilinases (classe D de Ambler) (AMBLER, 1980, CASTANHEIRA et al, 2008). Além disso, impermeabilidade da membrana externa associada a perda ou diminuição na expressão de porinas e produção de bombas de efluxo (HIGGINS et al, 2004, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Essas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico pela quebra da ligação amida, impedindo que os antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999). As  $\beta$ -lactamases podem ser encontradas no espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas e os genes que codificam a produção destas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (BUSH, 1989). Em *Acinetobacter* as  $\beta$ -lactamases de classe B e D apresentam maior frequência e atividade hidrolítica de carbapenemas, sendo denominadas também como carbapenemases (POIREL; NORDMANN, 2006).

As  $\beta$ -lactamases de classe A ou ESBLs conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, podendo conferir também níveis de resistência aos carbapenemas. Geralmente, são inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (THOMSON, 2010).

As carbapenemases classe B ou M $\beta$ L conferem alto nível de resistência aos carbapenemas e aos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção de monobactâmicos (aztreonam). Hidrolisam eficientemente carbapenemas, mas não aztreonam, e são inibidas por agentes quelantes, tais como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Além dos carbapenemas, a maioria destas enzimas hidrolisam cefalosporinas e penicilinas, já que os micro-organismos possuem mecanismos de resistência aos inibidores de beta-lactamases atualmente disponíveis (THOMSON, 2010). O mecanismo de hidrólise é dependente da interação dos  $\beta$ -lactâmicos com íons de zinco no sítio ativo da enzima, resultando na característica distintiva da sua inibição por EDTA, um quelante de  $Zn^{2+}$  e de outros cátions divalentes (WALSH et al, 2005).

As  $\beta$ -lactamases de classe C ou AmpC  $\beta$ -lactamases, conferem resistência às penicilinas, inclusive às suas associações com inibidores de  $\beta$ -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), às cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A hiperexpressão de AmpC confere resistência à maioria das cefalosporinas de amplo espectro, entretanto

cefepima e os carbapenemas não são hidrolisados por esta enzima (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Em relação às carbapenemases de classe D ou oxacilinases (OXA), até o momento, mais de 150 variantes distintas dessas enzimas já foram descritas, contudo apenas 45 exibem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos carbapenemas. Dentre os subgrupos filogenéticos já identificados, cinco foram descritos em *A. baumannii*, entre eles estão: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010, HIGGINS et al, 2009, HIGGINS et al, 2013). Todos os subgrupos estão relacionados à resistência adquirida aos carbapenemas, exceto o subgrupo OXA-51-like que é composto por enzimas intrínsecas de *A. baumannii* (HERITIER et al, 2005).

Para que os genes *bla<sub>OXA</sub>* sejam expressos, muitas vezes é necessária a presença de sequências de inserção (IS). As carbapenemases do tipo OXA, pertencentes aos grupos OXA-23-like, OXA-51-like e OXA-58-like, frequentemente possuem associação com essas SI. Várias SI já foram descritas em *Acinetobacter*, as mais comumente conhecidas são as *ISAb*1, *ISAb*2, *ISAb*3 e *ISAb*4 (TURTON et al, 2006b, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009). *ISAb*1, *ISAb*2, *ISAb*3, *ISAb*4, *ISAb*10, *ISAb*125, *ISAb*825 e *ISAb*18 já foram encontradas em isolados de *A. baumannii* juntamente ao grupo OXA-23 e OXA-58 (CORVEC et al, 2007, BERTINI et al, 2007, BOGAERTS et al, 2008, GIANNOULI et al, 2009, EVANS et al, 2010, LEE et al, 2011, RAVASI et al, 2011). Já o grupo OXA-51 possui associação com *ISAb*1 e *ISAb*9. Esta variedade de sequências contribui tanto para a resistência antimicrobiana, quanto para o aumento da plasticidade genômica (FIGUEIREDO et al, 2009b).

### 1.6.2 Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

As enzimas acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases caracterizam suscetibilidade variável para diferentes aminoglicosídeos. Essas enzimas foram encontradas em isolados de *A. baumannii*, sozinhas ou na maioria das vezes em combinação com outras enzimas. OS genes destas, podem estar localizados em plasmídeos, transposons ou em associação com integrons de classe I (SEWARD; LAMBERT; TOWNER, 1998).

Além disso, foram descritas, as 16S rRNA metiltransferases (RMT) (ArmA, e RmtA, B, C e D) que conferem também alto nível de resistência a todos os aminoglicosídeos disponíveis. Embora os membros da família RMT ainda não tenham sido encontrados em *A. baumannii*, o gene *armA* frequentemente é encontrado em combinação com gene *bla<sub>OXA-23</sub>* em outros micro-organismos (DOI et al, 2007, YU et al, 2007, KIM et al, 2008, CHO et al, 2009).

A inibição dessas proteínas induz a um desequilíbrio na síntese da parede celular, resultando na inibição do crescimento ou lise osmótica celular (ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008).

### 1.6.3 Diminuição da expressão de porinas (OMPs)

As porinas são proteínas capazes de formar canais que permitem o transporte de moléculas através da bicamada lipídica. Essas proteínas podem agir como alvos potenciais para adesão à células e ligação de compostos bactericidas na superfície de bactérias Gram-negativas. As porinas podem desempenhar um papel importante nos mecanismos de resistência, já que variações na sua estrutura ou na regulação da expressão são estratégias de sobrevivência desenvolvidas por muitas bactérias. Com isso, os micro-organismos são capazes de diminuir a permeabilidade da membrana externa motivadas por perdas ou diminuição da expressão de proteínas de membrana externa, como as porinas (OMPs, “*outer membrane proteins*”) (ZAVASCKI et al, 2010).

Isolados de *A. baumannii* têm relativamente poucas porinas quando comparados a outras bactérias Gram-negativas, o que pode explicar em parte sua resistência antimicrobiana intrínseca (SATO; NAKAE, 1991).

### 1.6.4 Produção de bomba de efluxo

Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa limita a quantidade de agentes antimicrobianos que entram na célula e o sistema de efluxo bombeia ativamente agentes antimicrobianos estruturalmente distintos para fora da bactéria (POOLE et al, 2002). Os transportadores presentes no sistema de efluxo são expressos em todas as células vivas,

protegendo-as de efeitos tóxicos de produtos químicos orgânicos. Multirresistência bacteriana tem sido frequentemente associada à superexpressão desses transportadores (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007).

As bombas de efluxo foram agrupadas em seis famílias: ABC (cassete ligado ao ATP), MFS (facilitador maior), RND (resistência, nodulação e divisão), MATE (efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas), SMR (pequena multirresistência) e DMT (transportador droga/metabólito). Elas estão distribuídas tanto em bactérias Gram-negativas, quanto em Gram-positivas (POOLE et al, 2002). Em *A. baumannii*, a resistência a antimicrobianos mediada por bomba de efluxo está geralmente associada com as famílias MFS e RND, nessas famílias o transporte de drogas para o meio extracelular ocorre através de antiporte, ou seja são dependentes de força próton-motriz (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007).

A produção de bombas de efluxo contribui substancialmente para a resistência a diversos antimicrobianos (DAMIER-PIOLLE et al, 2008). Além disso, esse é o principal mecanismo capaz de proporcionar resistência a agentes desinfetantes, sendo encontrado principalmente em isolados MDRs. Para Gram-negativos, resistência a desinfetantes também pode ser codificada pelo gene *qacE* (WALSH et al, 2005, COYNE et al, 2011).

A presença de cada fator de resistência pode variar entre os isolados. Os isolados MDR podem possuir um grande número de mecanismos que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos, adicionando assim, dificuldades em encontrar agentes antimicrobianos adequados para tratar a infecção.

#### 1.6.5 Outros mecanismos de resistência

Outros mecanismos de resistência incluem a regulação negativa das proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que confere resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (FERNÁNDEZ-CUENCA et al, 2003), mutações na DNA girase e topoisomerase IV, que confere resistência a fluoroquinolona (RIBERA et al, 2003), proteína ribossomal de proteção a tetraciclina (TetM) (VILA et al, 1997), redutase de di-hidrofolato putativa (FolA), envolvida na resistência trimetoprim (MAK et al, 2009) e mutações no regulador de dois componentes (pMRA/B) associado com resistência à polimixina (ADAMS et al, 2009).

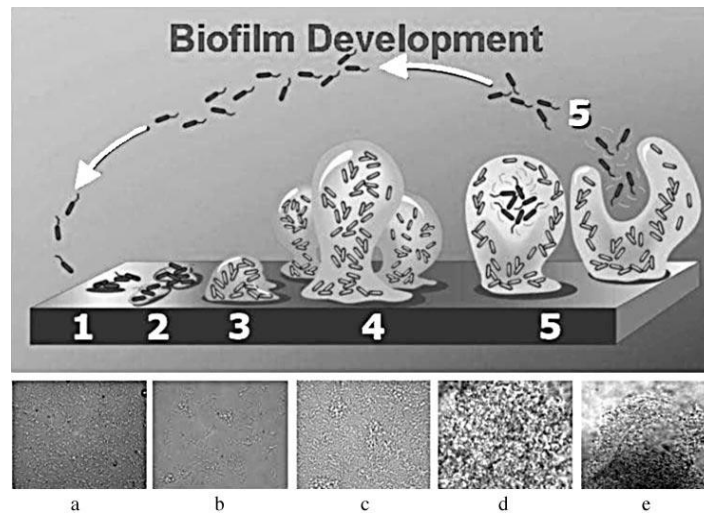
## 1.7 BIOFILME

Biofilmes bacterianos têm uma estrutura complexa e arquitetura dinâmica e podem se desenvolver em muitas superfícies abióticas (plástico, vidro, metal e sais minerais) e superfícies bióticas (plantas, animais e seres humanos). Apresentam três etapas no seu desenvolvimento. O primeiro passo inclui a aderência de bactérias planctônicas às superfícies. Esta adesão inicial pode ser mediada por contatos eletrostáticos ou interação de estruturas bacterianas (como por exemplo, proteínas e carboidratos) com as superfícies inertes ou revestidas com proteínas e carboidratos. O segundo passo é a proliferação dos colonizadores primários e a maturação do biofilme. Durante esta etapa, as bactérias podem se multiplicar sem soltar células descendentes, ou colonizadores primários recrutam e agregam membros planctônicos das mesmas espécies ou de outras espécies. As bactérias presentes ainda conseguem produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que estabilizam a arquitetura do biofilme. Enfim, numa terceira etapa, membros previamente sésseis do biofilme maduro se separam e atuam como colonizadores primários em diferentes locais. Muitas das propriedades de desenvolvimento do estabelecimento do biofilme, sejam elas metabólicas, genéticas e/ou físicas, a maturação e a separação são reguladas por sistemas de comunicação intra-espécies e inter-espécies que reagem à densidade populacional (por exemplo, regulação) (LEMBKE et al, 2006).

A estrutura de um biofilme, constituída por agregados de bactérias e uma matriz extracelular, em geral apresenta uma complexa rede de canais, que permite a difusão de nutrientes para manter o crescimento bacteriano e, ao mesmo tempo, proteger as bactérias de compostos tóxicos e reagentes presentes no ambiente, incluindo aqueles secretados tanto pela resposta imune inata do hospedeiro, quanto pela adaptativa (MANETTI et al, 2007). Bactérias embebidas em biofilmes demonstram suscetibilidade reduzida a agentes antimicrobianos. Isso ocorre, dentre outros fatores, devido à alta densidade populacional (que altera a expressão de diversos genes bacterianos) e à proteção física conferida pela matriz extracelular (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Cateteres intravenosos, válvulas cardíacas protéticas, próteses articulares, cateteres de diálise peritoneal, marcapassos cardíacos, implantes cerebrais e tubos endotraqueais são exemplos de dispositivos médicos que possuem um risco intrínseco de acumular biofilmes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004)

**Figura 1:** Diagrama demonstrando o desenvolvimento de um biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*. Etapas 1 e 2: fixação inicial de células à superfície; etapas 3 e 4: desenvolvimento precoce e maturação da arquitetura do biofilme; etapa 5: dispersão de células individuais do biofilme (STOODLEY et al, 2002).



A capacidade de aderir a superfícies bióticas e abióticas tem sido demonstrada em vários estudos de *A. baumannii* (LEE et al, 2008). Baixas exigências nutricionais e a capacidade de aderir a superfícies proporcionam a essa espécie uma maior resistência à dessecação, permitindo que ela sobreviva cerca de 30 dias em superfícies secas. Geralmente, essa aderência resulta no desenvolvimento de biofilmes (COSTERTON et al, 1999).

A capacidade de *A. baumannii* formar biofilmes lhe permite crescer persistentemente em ambientes com condições desfavoráveis. Foi demonstrado que *A. baumannii* é capaz de formar biofilmes em superfícies abióticas, incluindo vidro e equipamentos utilizados nas unidades de cuidados intensivo, e/ ou bióticas tais como, superfícies de células epiteliais (GADDY; ACTIS, 2009). E ainda, favorece sua sobrevivência sob condições de crescimento desfavoráveis e durante o tratamento com antimicrobianos, reduzindo significativamente sua suscetibilidade aos antimicrobianos, representando assim, uma ameaça para pacientes hospitalizados e um problema clínico significativo para os médicos que tentam escolher o regime terapêutico apropriado (MARAGAKIS et al, 2008).

Dentre os fatores mais comuns que controlam a formação de biofilme em superfícies abióticas, podemos incluir a disponibilidade de nutrientes, a presença de pili, de proteínas de membrana externa e secreções macromoleculares (polissacarídeos, ácidos nucleicos entre outros) (GADDY; ACTIS, 2009). O gene *csuE* foi identificado como sendo importante na formação do biofilme bacteriano, assim como na produção e montagem de pili (TOMARAS et al, 2003). Quando há a fixação da pili em superfícies abióticas, inicia-se a formação de

microcolônias e em seguida o desenvolvimento de estruturas de biofilme. Porém, ao contrário de biofilme em superfícies abióticas, estruturas pilus não foram relacionadas à adesão de *A. baumannii* às células epiteliais brônquicas (DE BREIJ et al, 2009). Já a proteína associada ao biofilme (BAP), está presente na superfície das células bacterianas e contribui para o desenvolvimento do biofilme e maturação por meio da estabilização do biofilme maduro em superfícies abióticas (como por exemplo, vidro) (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008, GADDY; ACTIS, 2009). Essa proteína ainda está envolvida na adesão a célula eucariótica, um passo importante na colonização do hospedeiro ou de superfícies bióticas (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012). A montagem de pili e a produção de (BAP) contribuem para o início de produção de biofilme e maturação após o micro-organismo aderir a superfícies (GADDY; ACTIS, 2009).

Em superfícies bióticas e abióticas já foi demonstrado que condições ambientais, tais como temperatura de crescimento e a concentração de ferro livre extracelular também afetam a quantidade de biofilme formado nessas superfícies. Há uma diminuição significativa na aderência e capacidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas e bióticas (plástico e células epiteliais do aparelho respiratório humano) quando *A. baumannii* é cultivado na presença de um agente quelante de ferro (LEE et al, 2006, LEE et al, 2008).

A formação de biofilmes em plástico, como poliestireno, e principalmente a aderência de *A. baumannii* às células epiteliais do aparelho respiratório está diretamente correlacionada com o nível de expressão do gene *bla<sub>PER-1</sub>* (RAO et al, 2008, LEE et al, 2008). Como esse gene também tem um papel importante na multirresistência nesse micro-organismo, isso sugere uma associação significativa entre multirresistência e biofilmes (LEE et al, 2008). Deste modo, o biofilme formado por *A. baumannii* pode aumentar sua capacidade de resistir a terapias com antimicrobianos, assim como outros tipos de stress ambientais, tais como desidratação e limitada disponibilidade de nutrientes (GADDY; ACTIS, 2009).

Um estudo demonstrou que a formação de biofilme em vidro pode ser influenciada pelo polissacarídeo extracelular poli- $\beta$ -(1,6)-N-acetilglucosamina (PNAG), que parece funcionar como uma adesina dentro do biofilme. A PNAG é regulada pelo locus *pga* e eventualmente sua produção influencia no crescimento do biofilme (CHOI et al, 2009).

### 1.7.1 Aderência às células eucarióticas



A aderência das bactérias às células epiteliais é um passo essencial para a colonização e infecção (BEACHEY, 1981). A aderência bacteriana às células hospedeiras é mediada por fímbrias ou componentes de membrana. Além disso, muitas bactérias patogênicas são capazes de invadir células não fagocíticas e evoluir para sobreviver no interior das células hospedeiras. A invasão celular pelas bactérias contribui para o processo de evasão da imunidade humoral, da persistência no hospedeiro e da penetração nos tecidos profundos. As bactérias conseguem entrar nas células não fagocíticas através de dois mecanismos; um denominado *ziper-like* e outro, gatilho, que foram inicialmente classificados com base em diferenças morfológicas. O mecanismo *ziper-like* (entrada mediada por receptor) requer a interação direta entre ligantes bacterianos e receptores da superfície celular do hospedeiro e ainda envolve o rearranjo do citoesqueleto no local da invasão. Por outro lado, o mecanismo de gatilho é iniciado pela injeção de proteínas efetoras bacterianas, essas proteínas regulam a dinâmica e induzem rearranjos do citoesqueleto, como protuberâncias na membrana (DRAMSI; COSSART, 1998, ALONSO; GARCÍA-DEL PORTILLO, 2004).

Estudos de aderência de *A. baumannii* às células epiteliais humanas são escassos, a infecção dessas células por esse micro-organismo foi associada à aderência e invasão desse patógeno nessas células (CHOI et al, 2008, LEE et al, 2008, LEE et al, 2006), e ainda, indução de morte celular (LEE et al, 2001, SMANI; McCONNELL; PACHON, 2012).

Este patógeno adere às células epiteliais humanas e também a filamentos de *C. albicans* independentemente do pili formado pelo sistema chaperone *csu*, sugerindo que não existe nenhuma correlação direta entre a formação de biofilme em superfícies abióticas e bióticas e que existe uma grande variação na superfície celular e nas interações celulares que resultam na aderência e formação de biofilme em diferentes isolados de *A. baumannii* (DE BREIJ et al, 2009, GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009).

Evidências crescentes sugerem que essa morte celular envolve ativação de caspases, o que poderia induzir apoptose das células humanas através da abertura de vias intracelulares (LEE et al, 2001, CHOI et al, 2005). Além de caspases, a proteína OmpA que é expressa na superfície da célula bacteriana, também contribui para a adesão do agente patogênico às células de diferentes tipos de tecidos.

## 1.8 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são aquelas adquiridas durante a prestação dos cuidados de saúde e constituem um grave problema de saúde pública mundial, já que aumentam a morbidade e a mortalidade entre os pacientes, e conseqüentemente a duração do tratamento da doença e a elevação dos custos envolvidos nesse cuidado (DAI et al, 2010). Nesse contexto, um dos desafios fundamentais para a prevenção e controle das IRAS é a dificuldade de contenção da resistência bacteriana. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) identificou a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes para a saúde humana (BASSETTI; GINOCCHIO; MIKULSKA, 2011) e os agentes patogênicos MDR mais comuns e graves foram englobados dentro da sigla "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) (RICE et al, 2008). Para a vigilância sanitária a expansão da resistência microbiana, vem sendo apontada como um dos maiores problemas de saúde pública. Por isso a identificação, a prevenção e o controle das IRAS representam medidas imprescindíveis para a intervenção sobre o risco em serviços de saúde, antes que o dano possa alcançar o paciente de forma indiscriminada. Além disso, a aplicação dos conceitos da vigilância epidemiológica a esses eventos evitáveis é o alicerce para a identificação oportuna e obtenção de informações de qualidade para a ação. Sendo assim, é essencial que se construa uma rede de dados a partir de informações de qualidade, verdadeiras e representativas da realidade nacional, para que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através de programas como o de uso racional de antimicrobianos e da rede de monitoramento de resistência microbiana, possa proteger e promover a saúde da população brasileira.

Nesse contexto, *Acinetobacter baumannii* tem recebido cada vez mais atenção como patógeno oportunista com grande importância em IRAS. É considerado um patógeno hospitalar persistente, devido a sua ampla distribuição nesse ambiente, além de demonstrar ampla resistência a vários antimicrobianos e associação crescente com infecções entre pacientes imunocomprometidos e feridos, principalmente em UTIs. O recente aumento na incidência, juntamente com um aumento dramático no aparecimento de isolados MDR, elevou significativamente o interesse neste patógeno (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Outro fator que pode influenciar no sucesso de *A. baumannii* como patógeno é sua capacidade de aderir a superfícies abióticas. Micro-organismos associados a biofilmes são considerados um importante problema de saúde pública, pois esse mecanismo, além de funcionar como uma barreira à ação dos antimicrobianos, pode ser fonte de infecção persistente, abrigar micro-

organismos patogênicos e ainda, permitir mudança do padrão de resistência aos antimicrobianos.

Apesar de vários relatos sobre o aumento de infecções por *A. baumannii*, estudos de virulência, além de escassos, estão focados em um ou apenas alguns isolados. No Brasil, não foram encontrados na literatura muitos estudos que relacionem isolados de *A. baumannii* a fatores envolvidos em sua virulência e patogenicidade, principalmente em células humanas. Por este motivo, é importante que se faça um estudo que tenha como foco isolados reconhecidamente circulantes no País, buscando esclarecer alguns mecanismos que justifiquem seu sucesso e persistência no ambiente hospitalar.

## 2 OBJETIVO GERAL

Estudar o polimorfismo genético, a resistência a antimicrobianos e os fatores de virulência em isolados de *Acinetobacter baumannii* coletados de dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro entre 2010 e 2011.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identificação dos isolados oriundos de dois hospitais do Rio de Janeiro;
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para polimixina B;
- Verificar a presença dos genes de oxacilinasas, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>; e da sequência de inserção *ISAbal1*, através da técnica de reação em cadeia da polimerase e sequenciamento;
- Avaliar o polimorfismo genético dos isolados através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Detectar a capacidade de diferentes isolados de *A. baumannii* formar biofilme sobre uma superfície de poliestireno;
- Descrever a taxa de associação (aderência e invasão) de diferentes isolados de *A. baumannii* às células epiteliais humanas provenientes da linhagem A-549 e HEp-2 por microscopia óptica e ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC);
- Investigar o grau de viabilidade das culturas infectadas com *A. baumannii* por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ISOLADOS CLÍNICOS

Foram estudados 92 isolados de *Acinetobacter baumannii*, coletados de pacientes hospitalizados em dois hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro, no período compreendido entre 2010 e 2011.

#### 3.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A partir dos isolados estocados, previamente identificados através do sistema automatizada Vitek 2 (BioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO) utilizando o cartão para identificação de Gram-negativos (GN, referência 21341), foi verificada a pureza desses isolados, observadas as características coloniais em meio de cultura Eosina Azul de Metileno (EMB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e Agar MacConkey (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA) após incubação por 18-24 horas a 37°C e as características morfo-tintoriais pela técnica de coloração de Gram. Os isolados também foram identificados através de testes bioquímicos convencionais como teste de motilidade, utilização do citrato (Simmons), produção de indol, oxidação e fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson, teste da produção da citocromo oxidase e crescimento a 42°C, segundo Murray et al (2010).

Os isolados classificadas como sendo do gênero *Acinetobacter* foram submetidas a novo crescimento em Agar Nutriente (NA, Gibco) para realização do estoque. Assim, após incubação por 18-24h, foi realizado o estoque das bactérias em tubos criogênicos contendo 1 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB, Gibco) e 20% de glicerol (v/v) a -70°C, e em tubos criogênicos contendo Agar estoque a temperatura ambiente.

#### 3.3 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO) e o cartão para suscetibilidade de Gram-negativos aeróbios com significado clínico (GN-105), seguindo as determinações do fabricante. Foram testados os seguintes antimicrobianos pertencentes a diferentes classes: amicacina, gentamicina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, ciprofloxacina, imipenem e meropenem (**Tabela 1**). O inóculo bacteriano inserido em cada cartão correspondeu a turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL). Então, os isolados foram classificados, segundo critérios de Maragakis e Perl (2008) em não-multirresistentes (n-MDR) e multirresistentes (MDR). Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentarem resistência a três ou mais classes dos seguintes agentes antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, aminoglicosídeos, quinolonas e polipeptídeos. Para o controle do teste foram utilizadas as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para polimixina B (500.000 UI) (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, SP) utilizando o método de microdiluição em caldo em microplacas de poliestireno (Corning® Costar® - Sigma-Aldrich, catálogo nº 32190102). A determinação do valor de suscetibilidade foi preconizado pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2015). Para esse ensaio, foram escolhidas as seguintes concentrações de polimixina B para serem testadas: 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,125 µg/mL. Após o crescimento dos isolados a 37°C por 24 h em meio agar nutriente, foram realizadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% equivalente a escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, as suspensões foram diluídas em 1:100 em caldo Mueller Hinton cátion ajustado pH 7,3 (CMHCA), de modo a se obter uma concentração final de células de  $1,8 \times 10^6$  UFC/mL. Então 50 µL de CMHCA foram adicionados em todos os poços da microplaca, exceto nos poços da coluna 1 (A1-A8). Posteriormente, 100 µL da maior concentração do antimicrobiano (64 µg/mL) foram colocados nos poços da coluna 1. Depois, 50 µL foram retirados do 1º poço (A1) e transferidos para o 2º poço (A2). Em seguida, após homogeneização com a pipeta, 50 µL foram retirados do 2º poço e transferidos para o 3º poço (A3). O procedimento foi repetido sucessivamente até o poço A11, e em seguida foi repetido nas linhas seguintes (B-H), para que todos os poços pudessem ficar com sua respectiva concentração de antimicrobiano. Por fim, a coluna 11 ficou com 100 µL e foi utilizada como controle de esterilidade da diluição do antimicrobiano e a última coluna da microplaca (12)

foi utilizada como controle do crescimento bacteriano, tendo sido inoculados 50 µL de CMHCA e 50 µL de suspensão bacteriana diluída. Após a adição das diferentes concentrações antimicrobianas na microplaca, foram inoculados 50 µL da suspensão bacteriana diluída em cada poço da microplaca, sendo um micro-organismo diferente em cada linha (A-H). A inoculação bacteriana dos poços foi realizada no intervalo de, no máximo, 30 minutos e posteriormente as placas foram homogeneizadas sobre a bancada em movimento rotatório e incubadas por 24 h a 37°C. A concentração mínima inibitória foi determinada como a primeira concentração que não apresentou crescimento bacteriano (turvação do meio). A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste e teve que apresentar CIM de 0,25 - 2,0 µg/mL.

**Tabela 1.** Classe dos antimicrobianos testados na avaliação da suscetibilidade dos isolados de *A. baumannii*.

Classes		Antimicrobianos testados
Penicilinas		Ampicilina e Sulbactam Piperacilina e Tazobactam
Cefalosporinas geração	3 <sup>a</sup>	Cefotaxima Ceftazidima
Cefalosporinas geração	4 <sup>a</sup>	Cefepima
Carbapenemas		Imipenem Merepenem
Aminoglicosídeos		Amicacina Gentamicina
Quinolonas		Ciprofloxacina
Polipeptídeos		Polimixina B

### 3.4 PESQUISA DE GENES DE OXACILINASES E SEQUENCIA DE INSERÇÃO

#### 3.4.1 Obtenção do ácido desoxirribonucleico genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *Dnease Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com recomendações do fabricante.

Para isso foram inoculados 100 µL do estoque bacteriano em 5 mL de TSB, os tubos foram incubados por 18-24 h a 37°C com agitação. Após incubação, foram transferidos 1 mL do crescimento bacteriano, para um microtubo com capacidade de 1,5 mL, que foi submetido à centrifugação a 24.000 g por 10 min. Após o sobrenadante ser desprezado, o sedimento foi ressuspenso em tampão ATL (do próprio kit) e lisozima (50 mg/mL em água Milli-Q) por 30 min a 37°C. Então foi adicionada proteinase K (20 mg/mL) e tampão AL (do kit), e o microtubo incubado a 56°C por 1 h. Após incubação, foi adicionada RNase (10 mg/mL) e álcool etílico (96-100%). Então o conteúdo da etapa anterior foi aplicado a coluna QIAmp (do kit) acoplada ao tubo e centrifugado a 43.000 g por 1 min, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor limpo, sendo adicionado o tampão AW1, novamente o sistema foi centrifugado a 10.000 g por 1 min. Então a coluna foi colocada em um novo tubo, porém foi adicionado o tampão AW2 e ocorreu nova centrifugação a 84.000 g por 3 min. Após colocar a coluna em um novo tubo foi adicionado o tampão AE e esse novo tubo levado a centrifugação por 27.000 g a 1 min.

Para certificação dessa extração, o material genético foi visualizado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X. Os produtos da PCR (4 µL) foram aplicados nos poços acrescido de 2 µl de tampão de carregamento (*loading buffer*). Assim como um padrão de DNA contendo fragmentos de tamanho conhecidos (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, Carlsbad, CA). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 1X, sob uma corrente de 60 V por 20 min e 90 V por 90 min. Após a corrida, o gel foi observado sob luz ultravioleta e registrado com o equipamento *Image Quant 300*.

### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a técnica de PCR foram usados *primers* específicos para amplificar os genes *rpoB*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *bla<sub>OXA-143</sub>* e *ISAbal* (**Tabela 2**). O aparelho utilizado para a realização das reações foi o termociclador *DNA PTC-200-Peltier Thermal Cycler* (MJ Research, Massachusetts, EUA).

Para a análise em particular do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (GUNDI et al, 2009), a reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 3 µL de DNA adicionados de 0,5 µL de tampão Taq DNA polimerase



(10X), 0,75 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM; MgCl<sub>2</sub>), 0,5 µL de desoxiribonucleotídeo trifosfatado (0,2 mM; dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µL de cada *primer* (0,2 mM; **Tabela 2**), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As amplificações foram realizadas seguindo o programa: pré-desnaturação por 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 52°C para desnaturação, 45 segundos a 52°C para anelamento e 2 min a 72°C para extensão; extensão final de 5 min a 72°C.

Foram realizadas reações de Multiplex-PCR, para a detecção das seguintes sequências gênicas: *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> (WOODFORD et al, 2006, HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010), de acordo com a metodologia descrita por Woodford et al (2006), com pequenas modificações. Para a amplificação de regiões específicas do genoma dos isolados de *A. baumannii*, a reação da Multiplex-PCR foi realizada em um volume final de 25 µL. A reação foi composta de 3 µL de DNA adicionados de 2,5 µL tampão Taq DNA polimerase (10X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 0,5 µL de cada dNTP (0,2 mM), 0,25 µL de cada *primer* (0,2 mM; **Tabela 2**), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e 72°C por 6 min.

Também foi realizada reação de PCR para a detecção da sequência de inserção *ISAbal* (MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009). Para a amplificação dessa região específica do genoma dos isolados de *A. baumannii* a reação da PCR foi realizada em um volume final de 25 µL. As reações individuais foram compostas de 3 µL do DNA adicionados de 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase (10X), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 0,5 µL de cada dNTP (0,2 mM), 0,4 µL de cada *primer* (0,2 mM; **Tabela 2**), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água Milli-Q estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 5 min.

Os amplicons das reações foram detectados através de reação eletroforética em gel de agarose a 1% em TBE 0,4X. Foi empregado um padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder - Invitrogen). A corrida ocorreu a 60V durante 20 min e 90V por 40 min. Foram misturados 2 µL de tampão de corrida (*loading buffer*) a 4 µL do produto da PCR. Após serem submetidos a solução de brometo de etídeo (0,5 mg/mL), os produtos da amplificação

foram visualizados com um transiluminador de luz ultravioleta em sistema de captura de imagens *Image Quant300*.

Foram utilizados como controles positivo dos genes estudados de cepas de *A. baumannii* do acervo interno do Setor Saneantes (*rpoB*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* e *ISAbal*) e da coleção de cultura de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) do Instituto Oswaldo Cruz *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>* e *bla<sub>OXA-143</sub>*.

**Tabela 2.** Sequências nucleotídicas dos *primers* específicos utilizados na amplificação dos genes *rpoB*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *bla<sub>OXA-143</sub>* e *ISAbal*.

Genes	Sequência do iniciador (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>rpoB</i>	F-TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G R-CMA CAC CYT TGT MCC RTGA	400	GUNDI et al, 2009
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	F-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	WOODFORD et al, 2006
<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	R-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA F-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	249	WOODFORD et al, 2006
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	R-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG F-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	WOODFORD et al, 2006
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	F-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	WOODFORD et al, 2006
<i>bla<sub>OXA-143</sub></i>	F-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT R-TAA TCC TGA GGG GGC CAA CC	± 150	WOODFORD et al, 2006
<i>ISAbal</i>	F-ATG CAG CGC TTC TTT GCA GG R-AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG	390	MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009

**Legenda:** pb, pares de base

R, purina (G ou A); Y, pirimidina (T ou C); M, amino, (A ou C).

### 3.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

#### 3.5.1 Purificação do produto da PCR

Somente o produto da amplificação do gene *rpoB* foi purificado. Essa purificação foi realizada utilizando a coluna de purificação *Purelink PCR purification Kit* (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Oitenta microlitros do tampão B2 (do próprio kit) foram adicionados a 20  $\mu$ L do produto da amplificação. Essa mistura foi aplicada na coluna *Purelink Spin Column* acoplada ao tubo coletor (do kit) e centrifugado a 10.000 g por 1 min. Após descartar o sobrenadante, a coluna foi recolocada no mesmo tubo coletor e foi adicionado o tampão W1 (do próprio kit) e centrifugado a 10.000 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e a coluna recolocada no mesmo tubo coletor e centrifugada. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um microtubo, sendo adicionado o tampão *Elution Buffer* no centro da coluna, que foi incubada a temperatura ambiente por 1min. Finalmente o tubo foi centrifugado a 10.000 g por 2 min e o DNA purificado foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.2 Determinação das sequências nucleotídicas

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

As reações foram realizadas em microplacas nas seguintes condições: 1  $\mu$ L de *BigDye Terminator* (Perkin Elmer); 5 pmoles do oligonucleotídeo; tampão 5x (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) e 100 – 150 ng de DNA para um volume final de 10  $\mu$ L. A seguir as placas contendo as reações foram encaminhadas para a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Após o sequenciamento dos isolados os dados foram analisados pelo *software* DNASTAR e posteriormente as sequências obtidas foram submetidas ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al, 1997), e comparadas a outras depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Assim, foi verificada a identidade do material sequenciado por meio do grau de similaridade com sequências depositadas no GenBank.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi realizada de acordo com o protocolo Pulsenet (NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004), com algumas modificações, utilizando a enzima de restrição *ApaI*.

Para o embocamento das células, a partir de um crescimento bacteriano em AN por 18-24 h/  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , foi obtida uma suspensão equivalente a escala 3,0 de McFarland em BSC (Tris 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0). Então, após a ressuspensão das células, foi adicionada proteinase K (50 mg/mL) e em seguida agarose *low melting* 1% (*Seaken Gold Agarose*), previamente aquecida, para o preparo dos discos. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram submetidos à tratamento enzimático contendo solução de lise (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 + sarcosil a 1%) e proteinase K (50 mg/mL), e foram incubados por 2 h a  $50^\circ\text{C}$  para a extração do DNA. Em seguida, o tampão de lise foi retirado e os blocos foram lavados 3 vezes com água Milli-Q por 15 min a  $50^\circ\text{C}$  e 1 vez com tampão TE (Tris, EDTA) nas mesmas condições. Os blocos foram então, incubados com 10 U da enzima de restrição *ApaI* (Amersham) durante 2 h a  $30^\circ\text{C}$ . Para separação dos fragmentos de DNA, foi realizado uma eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA) sob as seguintes condições: tempo de pulso crescente de 0,5 a 15 segundos, por 18 h a 6 V/cm, na temperatura de  $14^\circ\text{C}$ , com ângulo de  $120^\circ$  onde um disco de cada cepa foi depositado nas canaletas do gel de agarose a 1% (p/v; Gibco) em TBE 0,4 X. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), observados e fotografados no Image Quant 300. Os resultados obtidos foram analisados através de análise visual e dendrogramas confeccionados a partir da foto do gel no software Gel Compar II versão 4.0 (Applied Maths).

### 3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A quantidade de biofilme formado pelos isolados de *A. baumannii* foi medida através do ensaio de formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunclon™ -

Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo n° 269787), realizado de acordo com Moskowitz et al (2004), com modificações.

A partir do crescimento de 18-24 h a 37°C em AN, 2 a 3 colônias foram semeadas em 1 mL de Caldo Luria Bertani (LB) por 18-24 h a 37°C. A cultura foi ajustada em uma turvação em LB equivalente a escala 0,5 de McFarland e 100 µL foram transferidos para os poços da microplaca de 96 poços, que foi incubada por 18-24 h a 37°C. Cada isolado clínico foi testado em triplicata. Poços contendo apenas caldo LB foram utilizados como controles negativos. Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 100 µL de água Milli-Q, para retirada das bactérias em suspensão. Então, o biofilme formado foi corado com 100 µL de solução aquosa de cristal violeta 0,1% e incubado por 30 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavado 3 vezes com 100 µL de água Milli-Q em cada poço, para retirar o excesso de cristal violeta. A microplaca foi deixada à temperatura ambiente para secar por aproximadamente 1 h. A fim de solubilizar o cristal violeta adsorvido, foram adicionados 150 µL de etanol 95% por 15 min à temperatura ambiente. Por fim, a microplaca foi submetida a espectrofotômetro e então foi medida a absorbância a 590nm.

*A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizado como controle positivo. Como controle negativo foram considerados os poços com meio de cultura não inoculado. Também foi incluída a cepa de *Escherichia coli* K-12, considerada um fraco produtor de biofilme.

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

Para a análise estatística, foi utilizado o teste do valor extremo (Grubbs), onde P valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.8 AVALIAÇÃO DO GRAU DE ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS COM ISOLADOS DE *A. baumannii*

A avaliação do grau de associação das bactérias às células tumorais A-549 e HEP-2 foi realizada através da microscopia óptica. Para as células HEP-2, o grau de associação também foi avaliado por ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia

(UFC) e avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT). Cada experimento foi realizado em triplicata.

### 3.8.1 Cultivo e manutenção de células epiteliais

Foram utilizadas para os experimentos, células tumorais epiteliais alveolares humanas (A-549, American Type Culture Collection) e células epiteliais de carcinoma laríngeo humano (HEp-2, American Type Culture Collection).

Para o início do cultivo das células A-549, as células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e ressuspensas em um volume de 10 mL de meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, Gibco) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e 1% de estreptomicina. As células então, foram incubadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Nunclon™-Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y) em atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C, até obter uma confluência de 80%. Após incubação, as células epiteliais foram desprendidas utilizando 1 mL de tripsina (2,5%) e levadas à estufa por 1 min a 37°C. Em seguida, 9 mL de meio DMEM completo foram adicionados e a suspensão, centrifugada por 10 min a 730 g. Então, o sobrenadante foi descartado, as células foram novamente ressuspensas em 10 mL de meio DMEM completo. As células que foram utilizadas nos experimentos foram contadas em câmara de Neubauer e em seguida plaqueadas em placa de 24 poços (Nunclon™-Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y) com lamínulas de vidro. Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, sob orientação da Dra. Márcia Berredo Pinto e Dr. André Alves Dias do laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

As células HEp-2, já foram cedidas plaqueadas ( $4 \times 10^4$  células) em placa de 24 poços (Nunclon™), com ou sem lamínula de vidro, ou em microplaca de 96 poços (Corning® Costar®-Sigma-Aldrich, catálogo n° 32190102). Este estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Edson Elias dos Santos, chefe do laboratório de Enterovírus do IOC, e a técnica Elaine Maciel da Silva.

### 3.8.2 Isolados clínicos

Para este estudo foram selecionados os isolados bacterianos representativos dos clones prevalentes A (33677) e B (34371); e dos clones esporádicos C (96734), D (99677), E (97506) e F (30654). Foi também utilizada a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606.

### 3.8.3 Preparo dos isolados de *A. baumannii*

Primeiramente as células bacterianas foram descongeladas e alíquotas foram inoculadas em Caldo Nutriente (CN, Difco) e incubadas por 18-24 h a 37°C. Após crescimento, foi realizado um novo cultivo em AN, nas mesmas condições. Então, a cultura foi ajustada em uma turvação em meio DMEM completo equivalente a 2 da escala McFarland

As células epiteliais, previamente plaqueadas em placas de 24 poços, foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Após a adição de 450 µL de DMEM completo sem antimicrobianos, as células epiteliais foram infectadas com 50 µL do inóculo bacteriano.

Já as células epiteliais presentes em microplacas de 96 poços, foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Após a adição de 90 µL de DMEM completo sem antimicrobiano, as células foram infectadas com 10 µL do inóculo bacteriano.

As células infectadas com as bactérias foram centrifugadas a 730 g por 10 min à temperatura ambiente e incubadas por 2 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.8.4 Microscopia óptica

Finalizada a incubação de 2 h, as lamínulas foram lavadas com tampão salina-fosfato 1X pH 7,2 (PBS 1x, LGC Biotecnologia), as células fixadas por 10 min com metanol e coradas por 30 min com Giemsa. Então, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas de vidro, visualizadas e fotografadas no microscópio óptico com lente de imersão num aumento de 40x (LEE et al, 2008; SILVA et al, 2013).

Em cada campo visualizado no microscópio óptico foram contadas as bactérias que se associaram (aderiram ou infectaram) às células epiteliais humanas. Foi obtido o número de bactérias que se associaram por 300 células HEp-2 ou A-549  $\pm$  45.

Para a análise estatística, o teste *Mann Whitney* para variáveis não-paramétricas foi usado, com nível de significância de 95%. Esse teste foi aplicado para comparar os valores das contagens da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 por 300 células, com os valores das contagens de cada isolado representante de cada clone também por 300 células A-549 ou HEp-2. Além disso, esse teste também foi utilizado para comparar os valores das contagens da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e de cada isolado representante de cada clone por 300 células A-549, com os valores das contagens da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e de cada isolado representante de cada clone por 300 células HEp-2.

### 3.8.5 Ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)

O ensaio foi realizado segundo Choi et al (2008), com algumas modificações. Após 2 h de incubação a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e os poços lavados 3 vezes com PBS 1X. Um novo meio de cultura contendo 250 µg/mL de polimixina B foi adicionado a cada poço e incubado por mais 2 h para matar todas as bactérias extracelulares. Após esse tempo, os poços foram novamente lavados por 3 vezes com PBS e as células foram lisadas com Triton X-100 0,1X em PBS 1X por 20 min a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. A contagem de UFC foi realizada através de diluições sucessivas em solução salina 0,85%. As diluições de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram plaqueadas em placas de Agar MacConkey e incubadas por 24 h a 37°C. A leitura foi feita nas placas onde houve crescimento.

Nesse ensaio, além da cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606, foi utilizada a cepa de *Yersinia enterocolitica* O:3, utilizada como controle positivo para invasão bacteriana, gentilmente cedida pela Dra. Dayse Christina Valim do Laboratório de *Listeria* do IOC.

### 3.8.6 Avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT)



Diferente dos demais, neste experimento foi utilizada a microplaca de 96 poços. Após a incubação por 2 h das células previamente infectadas, 20 µl do meio DMEM completo foram retirados e 20 µL de MTT (0,2 mg/mL) foram adicionados aos poços. Então as células infectadas adicionadas de MTT foram incubadas por 4 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e após esse tempo, foram adicionados 20 µl de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 590 nm em espectrofotômetro (SIEUWERTS et al, 1995).

As DO obtidas foram expressas como porcentagens do total de células viáveis para cada poço, que continha a célula infectada com a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 e com o isolado representante de cada clone, em relação aos controles negativos, que continham as células HEp-2 e o meio DMEM completo.

Para a análise estatística, foi utilizado teste do valor extremo (Grubbs), onde P valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Também utilizamos o teste *t student*, com nível de significância de 95%, para comparar a porcentagem de viabilidade das células após serem infectadas com a cepa *A. baumannii* ATCC 19606, com as porcentagens de viabilidade das células após serem infectadas com o isolado representante de cada clone.

### 3.9 ASPECTOS ÉTICOS

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

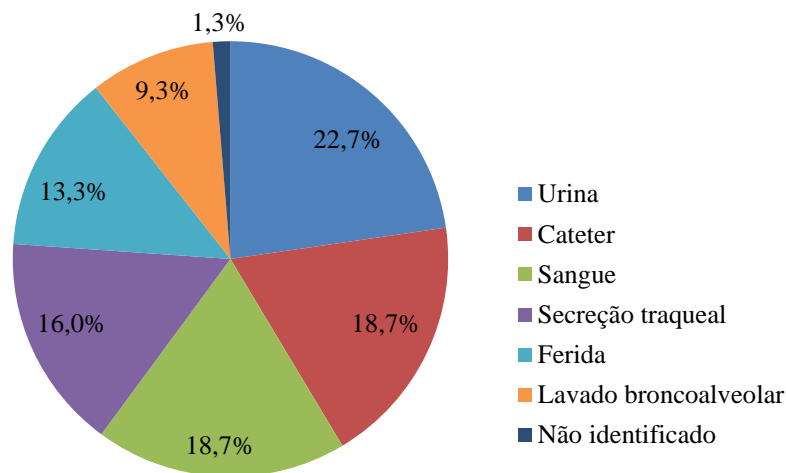
## 4 RESULTADOS

### 4.1 DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS

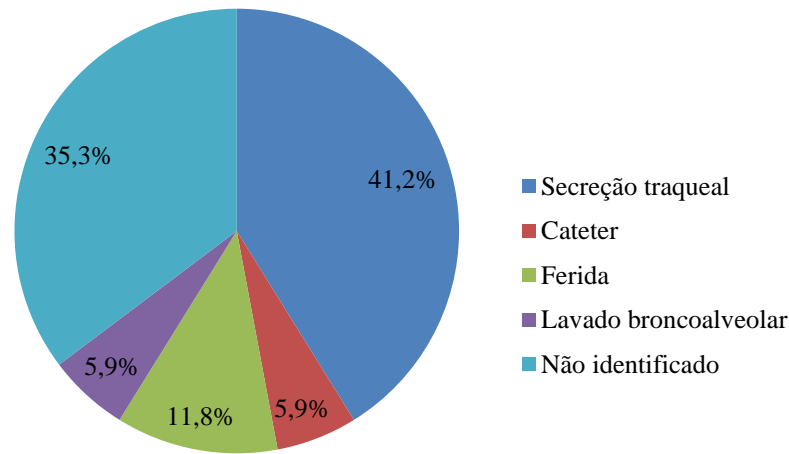
Dentre os 92 isolados do gênero *Acinetobacter* estudados, a maioria foi proveniente do Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE) (81,5%; n=75). O restante dos isolados se originou de pacientes do Hospital Universitário Gaffrée Guinle (HUGG) (**Figura 2**).

Os isolados de *Acinetobacter* foram coletados a partir de diferentes sítios, sendo a maioria dos isolados que haviam sido coletados no HFSE, a maioria foi oriundo de urina (22,7%; n=17), sangue e cateter (18,7%; n=14, cada) e secreção traqueal (16%; n=12), seguido de ferida e lavado broncoalveolar. Não foi identificado o sítio de coleta de apenas 1,3% (n=1) dos isolados coletados nesse hospital (**Figura 2**). Dentre os isolados coletados no HUGG, a maioria foi oriundo de secreção traqueal (41,2%; n=7). Não foi identificado o sítio de coleta de 35,3% (n=6) dos isolados estudados (**Figura 3**).

**Figura 2.** Distribuição em percentagem dos 75 isolados de *Acinetobacter* coletados do HFSE em relação aos diferentes sítios de coleta.



**Figura 3.** Distribuição em percentagem dos 17 isolados de *Acinetobacter* coletados do HUGG em relação aos diferentes sítios de coleta.



#### 4.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Foram realizados testes bioquímicos convencionais para todos os isolados oriundos dos dois hospitais da rede pública do Rio de Janeiro. Esses testes foram importantes na primeira etapa da confirmação da identificação desses isolados. Na **Tabela 3**, são apresentados os resultados esperados para os testes bioquímicos convencionais relevantes para a identificação de micro-organismos do gênero *Acinetobacter*.

Como resultado, todos os 92 isolados que foram previamente submetidos aos testes bioquímicos foram identificados como *Acinetobacter baumannii*.

**Tabela 3.** Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação de *Acinetobacter baumannii* e espécies relacionadas (MURRAY et al, 2010).

Micro-organismos	MOT	CIT	INDOL	OF-G	OXI	Cresc. a 42°C
<i>A. baumannii</i>	neg	+	neg	O	neg	+
<i>A. calcoaceticus</i>	neg	+	neg	O	neg	neg
<i>A. haemolyticus</i>	neg	+	neg	Inerte/O	neg	neg
<i>A. lwoffii</i>	neg	neg	neg	Inerte	neg	neg

**Legenda:** MOT, teste de motilidade; CIT, utilização do citrato (Simmons); INDOL, produção de indol; OF-G, oxidação e fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson; OXI, teste da produção da citocromo oxidase; Cresc. a 42°C, crescimento a 42°C.

Para confirmar a identificação desses isolados quanto a espécie, houve a necessidade de se realizar uma identificação molecular através da amplificação por PCR e sequenciamento do gene *rpoB*. Através dessa metodologia foi possível identificar os isolados a nível de espécie, sendo todos pertencentes à espécie *Acinetobacter baumannii* (similaridade de 99 – 100%).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os isolados foram classificados em não-multiressistentes (n-MDR) e multirresistentes (MDR), de acordo com o perfil de suscetibilidade às classes de antimicrobianos (MARAGAKIS; PERL, 2008).

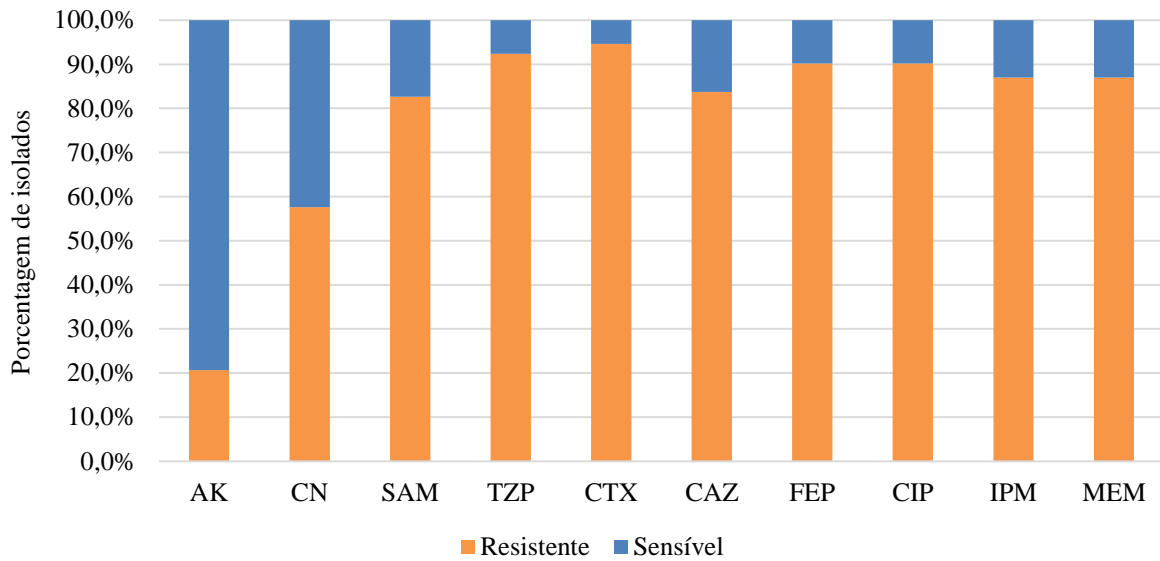
Foram encontrados 6,5% (n=6) de isolados de *A. baumannii* com perfil n-MDR (30960, 31711, 31852, 33015, 97253 e 97326). Oitenta e seis (93,5%) isolados apresentaram perfil MDR e 12 (240, 30794, 30975, 31063, 49147, 52743, 96681, 96734, 97506, 97943, 99677 e 99912) (13%) isolados foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas.

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que 94,6% (n=87) apresentou resistência à cefotaxima, 92,4% (n=85) à piperacilina/tazobactam, 90,2% (n=83) à ciprofloxacina e à cefepima, 87% (n=80) ao imipenem e meropenem, 83,4% (n=77) para ceftazidima e 82,6% (n=76) à ampicilina/sulbactam. O maior percentual de suscetibilidade foi observado para amicacina (79,3%, n=73). Para gentamicina a porcentagem de resistência foi de 57,3% (n=53). (**Figura 4**).

Todos os isolados classificados como n-MDR (n=6) estavam presentes no HFSE e foram coletados de urina (n=3), cateter (n=2) e ferida (n=1). Já entre os isolados que apresentaram resistência aos carbapenemas (n=80) foi possível notar que a maioria deles foi coletado de secreção traqueal (22,5%, n=18).

Dentre os isolados que foram classificados como n-MDR, todos foram suscetíveis aos carbapenemas. Já entre os isolados MDR (n=86), nenhum apresentou suscetibilidade a esses antimicrobianos. Dentre os isolados suscetíveis aos carbapenemas (7962, 30159, 30960, 31711, 31852, 33015, 48538, 50061, 97253, 97326, 97432 e 98218), a maioria estava presente no HFSE, somente um (7962) pertencia ao HUGG (**Tabela 4**).

**Figura 4.** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados dos 92 isolados de *A. baumannii*.

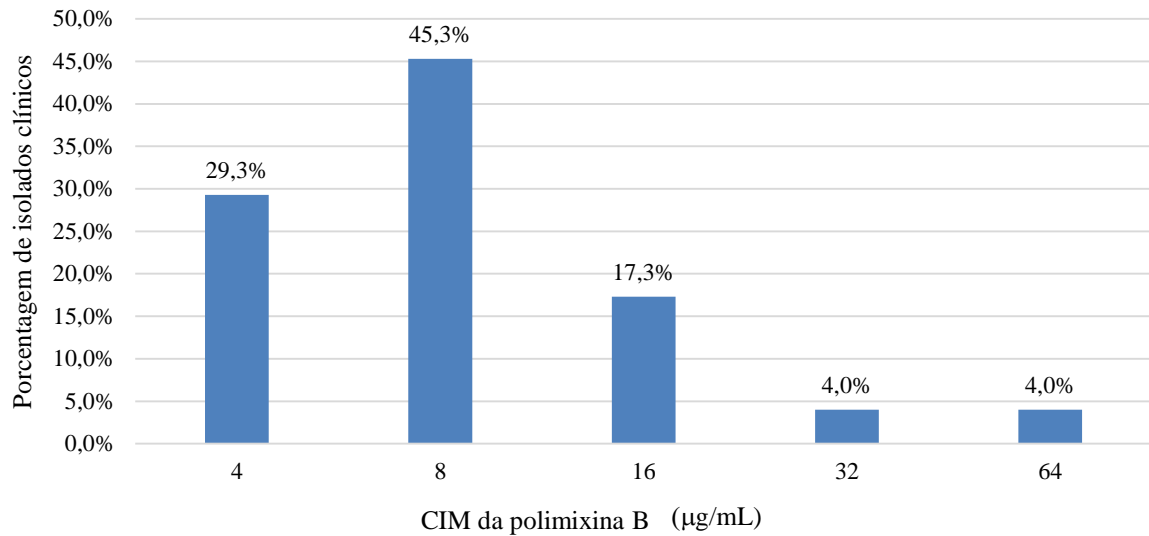


**Legenda:** AK, amicacina; CN, gentamicina, SAM, ampicilina/sulbactam; TZP, piperacilina/tazobactam, CTX, cefotaxima, CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima, CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem. Os isolados que apresentaram resistência intermediária foram considerados resistentes.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados para polimixina B foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015). Por esse método, observamos um número reduzido de isolados suscetíveis a esse antimicrobiano (7866, 7868, 8076, 9007, 30159, 30264, 30582, 30634, 30654, 30719, 30763, 30942, 3371, 98250, 99133, 99164 e 99324) (18,5%; n=17). Dentre os isolados suscetíveis, 2 apresentaram CIM de 1 µg/mL e os outros 15, apresentaram CIM de 2 µg/mL. A maioria dos isolados foi resistente à polimixina B, 81,5% (n=75), apresentando valores de CIM entre 4-64 µg/mL (**Figura 5**).

Nos isolados suscetíveis à polimixina B (n=17) apenas 4 (7866, 7868, 8076, 9007) estavam presentes apenas no HUGG. Dentre os isolados que apresentaram resistência à polimixina B (n=75) foi possível notar que a maioria deles foi coletado de urina (18,8%, n=15).

Entre os isolados MDR, 80,2% (n=69) apresentaram resistência à polimixina B e entre os isolados resistentes aos carbapenemas, 80% (n=64) também apresentaram resistência à polimixina B. Apenas um isolado apresentou suscetibilidade aos carbapenemas e à polimixina B (30159).

**Figura 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados resistentes à polimixina B.**Tabela 4.** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e o número de isolados de *A. baumannii* incluídos em cada perfil.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	Nº de isolados suscetíveis
AK; CN; SAM; CAZ; IPM; MEM; FEP; TZP; CIP; CTX	5
AK; CN; SAM; CAZ; IPM; MER; FEP; TZP; CIP	2
AK; CN; SAM; IPM; MER; CIP	1
AK; CN; PB; IPM; MEM	1
AK; CN; SAM; IPM; MER	1
AK; CN; SAM; CIP	1
AK; SAM; IPM; MEM	2
AK; CN; PB	7
AK; CN	16
AK; PB	5
AK; SAM	3
AK; CAZ	8
CN; PB	1
AK	21
CN	4
PB	1
SAM	1
Ausência de suscetibilidade	12

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

#### 4.4 PESQUISA DE GENES DE OXACILINASES E SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO

Nos 92 isolados de *A. baumannii* foram pesquisados os genes *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>, codificadores de oxacilinasas e a sequência de inserção, *ISAbal*, que está diretamente relacionada ao aumento da expressão desses genes de resistência (MUGNIER et al, 2009).

Dos 92 isolados estudados, todos apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e 92,3% (n=85) apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Não foi detectada a presença de nenhum outro gene de oxacilinasas nesses isolados. Já na pesquisa do gene da sequência de inserção *ISAbal*, todos os isolados foram positivos para esse gene.

Nos isolados MDR (n=86), apenas 4 (33314, 34371, 48538 e 50061) (4,7%) não possuía o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Dentre os isolados resistentes aos carbapenemas (n=80), 97,5% (n=78) tiveram a presença confirmada dos 2 genes codificadores de oxacilinasas, *bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub>, além da sequência de inserção *ISAbal*. Ainda observamos que dentre os 12 isolados suscetíveis aos carbapenemas, 41,6% (n=5) (31711, 48538, 50061, 97253 e 97326) foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Todos os 92 isolados de *A. baumannii* foram submetidos à análise do polimorfismo genético através da técnica de PFGE, após restrição total do DNA com a endonuclease de restrição *ApaI*.

Foi observado um total de 22 clones (A ao U) com 65% de similaridade (**Figura 6**). O clone A representado por 30,4% (n=28) dos isolados foi o mais prevalente; seguido do clone B, 18,5% (n=17) dos isolados; clone C e D, 8,7% (n=8) dos isolados, cada; clone E, 7,6% (n=7) dos isolados; clone F, 6,5% (n=6) dos isolados; clone G, 3,3% (n=3) dos isolados e os demais clones de H ao U foram representados apenas por um pulsotipo 1,1% (n=1) (**Figura 6**).

Os clones A, B e C estavam presentes em isolados dos dois hospitais estudados, já os demais estavam presentes em apenas um deles. No HFSE estavam 82,1% (n=23) dos isolados

pertencentes ao clone A (n=28), 47,1% (n=8) dos isolados do clone B (n=17), 87,5% (n=7) dos isolados do clone C (n=8) e os isolados pertencentes aos outros 17 clones (D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V). Os isolados pertencentes aos clones A, B e C presentes no HUGG estavam distribuídos da seguinte maneira, 17,9% (n=5) pertencentes ao clone A, 52,9% (n=9) pertencentes ao clone B e 12,5% (n=1) pertencentes ao clone C. E os isolados representados pelas letras O e U que possuíam apenas um pulsotipo.

Após correlacionarmos o sítio de coleta dos isolados com os perfis de PFGE, foi observado que entre os isolados pertencentes aos clones prevalentes A e B, a maioria foi coletado de secreção traqueal, 24,4% (n=6) e 41,1% (n=7), respectivamente. Nos isolados do clone C, a maioria foi coletado de ferida (37,5%; n=3), nos isolados pertencentes ao clone D, urina (37,5%; n=3), nos isolados pertencentes ao clone E, sangue e ferida (28,6%; n=2, cada), nos isolados do clone F, secreção traqueal e sangue, (33,3%; n=2, cada), e nos isolados do clone G, lavado broncoalveolar (66,7%; n=2) (**Tabela 5**). Nos clones que foram representados por apenas um pulsotipo (H ao U) os isolados foram coletados de urina, sangue, cateter, ferida e secreção traqueal.

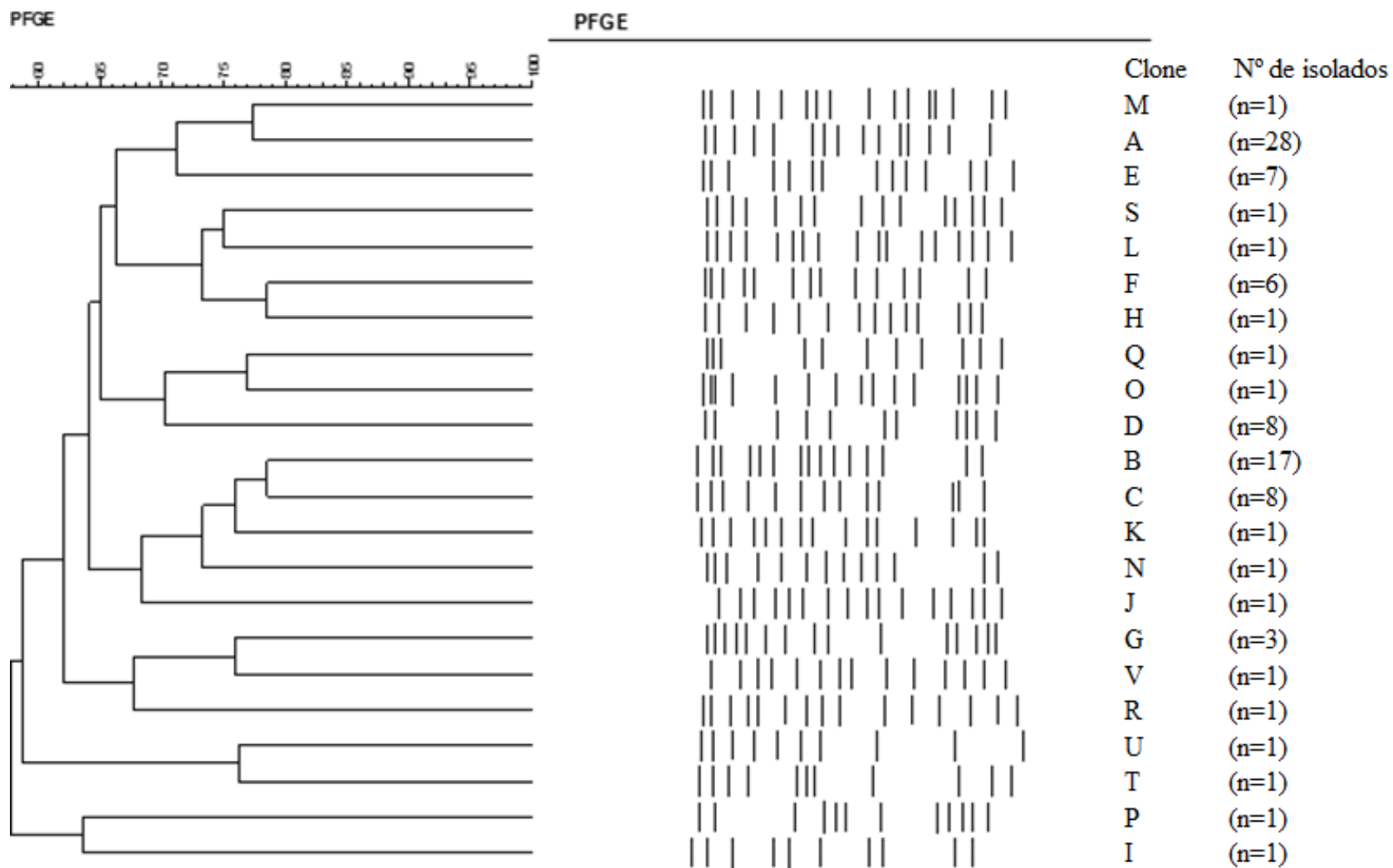
**Tabela 5.** Distribuição do sítio de coleta em relação ao perfil clonal dos isolados obtidos por PFGE.

Sítio de Coleta	Clones (%)						
	A	B	C	D	E	F	G
Secreção traqueal (n=19)	21,4	41,2	25	0	14,2	33,3	0
Urina (n=17)	14,3	11,8	25	37,5	14,3	16,7	0
Cateter (n=16)	14,3	11,8	12,5	25	14,3	16,7	33,3
Sangue (n=14)	17,9	5,9	0	12,5	28,6	33	0
Ferida (n=12)	10,7	17,6	37,5	12,5	28,6	0	0
Lavado broncoalveolar (n=8)	14,3	0	0	12,5	0	0	66,7
Não identificado (n=7)	7,1	11,8	0	0	0	0	0

Obs: Somente foram apresentados os pulsotipos com pelo menos dois isolados.



**Figura 6.** Dendrograma dos isolados de *A. baumannii*, construído com o auxílio do Gel Compar II versão 4.0 (Applied Maths). Os padrões das bandas foram detectados através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *ApaI*.



Através do PFGE, dentre os isolados n-MDR (n=6), foi possível observar que a maioria deles foi agrupado apenas em clones esporádicos (S, Q, R, M, V). Apenas um isolado de *A. baumannii* classificado como n-MDR pertencia ao clone prevalente A (97326). Na classificação MDR atribuída a maioria dos isolados estudados, estavam representantes de diversos clones, tanto prevalentes quanto esporádicos.

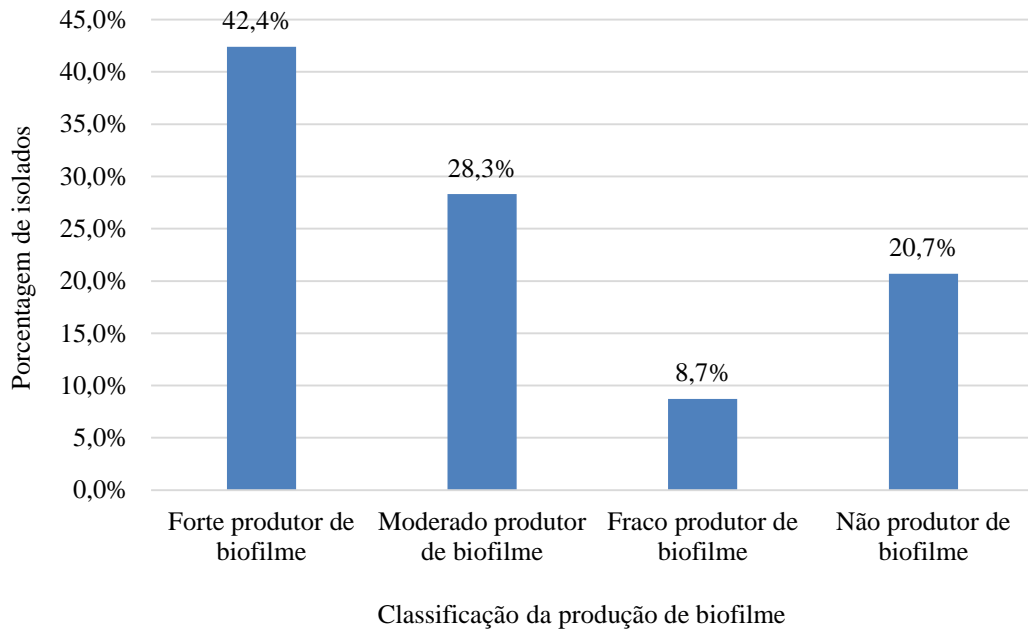
Os isolados resistentes aos carbapenemas (n=80) foram agrupados em diversos clones. Já os isolados suscetíveis a esses antimicrobianos, que possuíam ou não o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (n=12) foram agrupados em 12 clones (A, B, C, H, J, K, L, M, O, Q, R e S). Desses, 3 isolados (30159, 97326 e 98218) pertenciam a clones que também agruparam isolados resistentes ao imipenem e meropenem (A, B e C).

Os isolados resistentes à polimixina B (n=75) também foram agrupados em diversos clones. Já os isolados suscetíveis (n=17) foram agrupados em 7 clones (A, B, C, E, F, G e U). Quinze desses isolados (7866, 7868, 8076, 9007, 30159, 30264, 30582, 30634, 30654, 30719, 30942, 34371, 98250, 99133, 99164 e 99324) pertenciam a clones que também agruparam isolados resistentes à polimixina B (A, B, C, E, F e G).

#### 4.6 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Na avaliação da formação de biofilme pelos isolados, esses foram classificados em produtores de biofilme forte, moderado, fraco e não produtores de biofilme, após coloração com cristal violeta e solubilização do biofilme com etanol. A média da Densidade Óptica (DO) dos 92 isolados estudados variou de 0,049 a 2,435. O ponto de corte da DO para o teste foi definido como a DO do controle negativo (DO<sub>c</sub>) que foi de 0,283, neste estudo. Os isolados foram agrupados em não produtor (DO < 0,283), fraco (0,283 < DO ≤ 0,566), moderado (0,566 < DO ≤ 1,132) e forte (DO > 1,132). Observamos que a maioria dos isolados foi capaz de formar biofilme 79,3% (n=73), sendo 42,4% (=39) dos isolados capazes de formar biofilme fraco, 28,3% (n=26) biofilme moderado e 8,7% (n=8) formaram biofilme forte (6,1%). Apenas 20,7% (n=19) dos isolados não foram capazes de formar biofilme. Os resultados aqui descritos são apresentados na **Figura 7**.

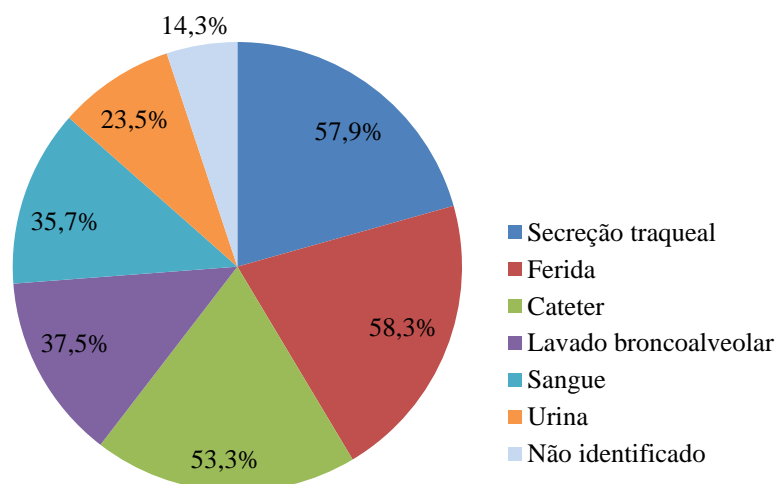
**Figura 7.** Classificação dos isolados de *A. baumannii* quanto o tipo de produção de biofilme.



A maioria dos isolados que formou biofilme (n=73) estava presente no HFSE (83,6%, n=61), assim como aqueles que não formaram biofilme.

Ao relacionarmos a formação de biofilme forte com o sítio de coleta dos isolados, observamos que a maioria dos isolados que apresentou biofilme forte foi coletada de ferida (58,3%, n=7), seguido de secreção traqueal (57,9%, n=11) e cateter (53,3%, n=15) (**Figura 8**).

**Figura 8.** Relação entre o sítio de coleta e a porcentagem dos isolados que formaram biofilme forte.



Dentre os isolados classificados como MDR (n=86), a maioria foi de produtor de biofilme (79%, n=68). Porém a maioria dos isolados n-MDR (n=6) também produziu biofilme (83,3% n=5), apenas um isolado (31852) que teve essa classificação não era produtor.

A maioria dos isolados que eram resistentes aos carbapenemas (n=80) foi produtor de biofilme (78,5%, n=63). Já entre os isolados suscetíveis a esse antimicrobiano (n=12), 83,3% (n=10) foram capazes de formar e apenas 2 não apresentaram essa capacidade (30159 e 31852).

Assim como nos isolados resistentes aos carbapenemas, a maioria dos isolados resistentes à polimixina B (n=75) foi produtor de biofilme (80%, n=60). Também observamos que mais da metade dos isolados produtores (55%, n=33), foram classificados como produtores de biofilme forte.

Não foi possível correlacionar a formação de biofilme com os clones considerados predominantes, já que em todos os clones foi observada a presença de isolados capazes de formar biofilme. Dentre os isolados que não formaram biofilme (n=19), 57,9% (n=11) pertenciam aos clones prevalentes A e B, os demais pertenciam aos clones esporádicos C, D, F, G e R.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO GRAU DE ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS COM ISOLADOS DE *A. baumannii*

Para avaliação do grau de associação das bactérias às células epiteliais, foram selecionados os isolados bacterianos representativos dos clones prevalentes A (33677) e B (34371); e dos clones esporádicos C (96734), D (99677), E (97506) e F (30654). Além das cepas de referência *A. baumannii* ATCC 19606 e de *Yersinia enterocolitica* O:3, utilizada como controle positivo para invasão bacteriana.

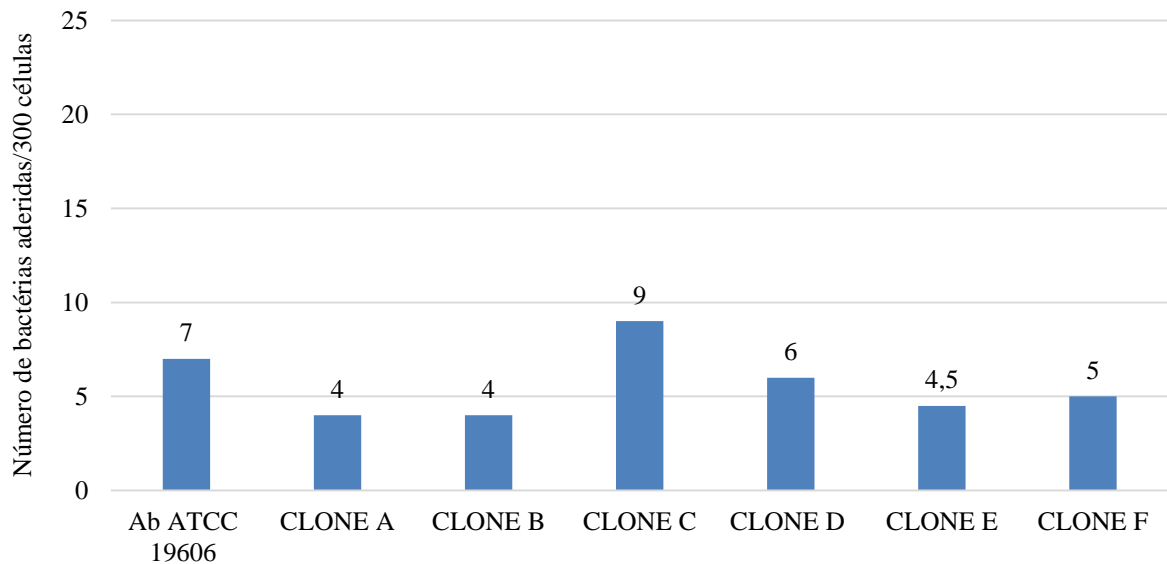
No ensaio para avaliação da adesão das bactérias às células epiteliais humanas por microscopia óptica, os campos fotografados no microscópio óptico em um aumento de 40x, foram contados até chegar ao número total de bactérias associadas por  $300 \pm 45$  células (bactérias/300 células) (LEE et al, 2008).

No ensaio de associação às células tumorais derivadas de célula epitelial alveolar humana (A-549), foi possível evidenciar a adesão da cepa de referência *A. baumannii* ATCC

19606 (**Figura 10**) e dos isolados selecionados, representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) (**Figura 11**).

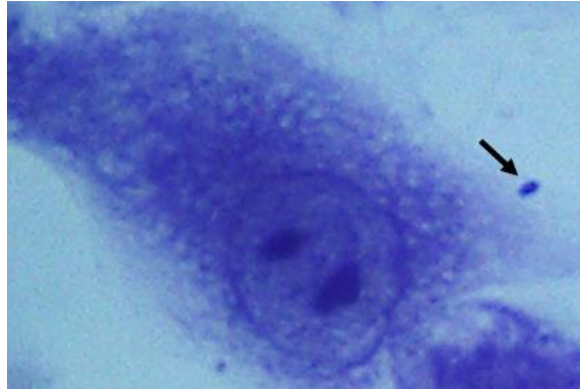
A mediana das contagens do número total de bactérias/300 células, variou entre 4 e 9 para os 6 isolados de *A. baumannii* analisados e foi de 7 para a cepa ATCC 19606. O isolado representante do clone A, apresentou 4 bactérias/300 células, o isolado do clone B, 4 bactérias/300 células, o isolado do clone C, 9 bactérias/300 células, o isolado representante do clone D, 6 bactérias/300 células, o isolado do clone E, 4,5 bactérias/300 células, e o isolado do clone F, apresentou 5 bactérias/300 células (**Figura 9**).

**Figura 9.** Grau de associação dos isolados de *A. baumannii* às células A-549 após 2 h de infecção. Os resultados estão apresentados através do cálculo da mediana das leituras referentes ao número de bactérias aderidas por 300 células visualizadas.

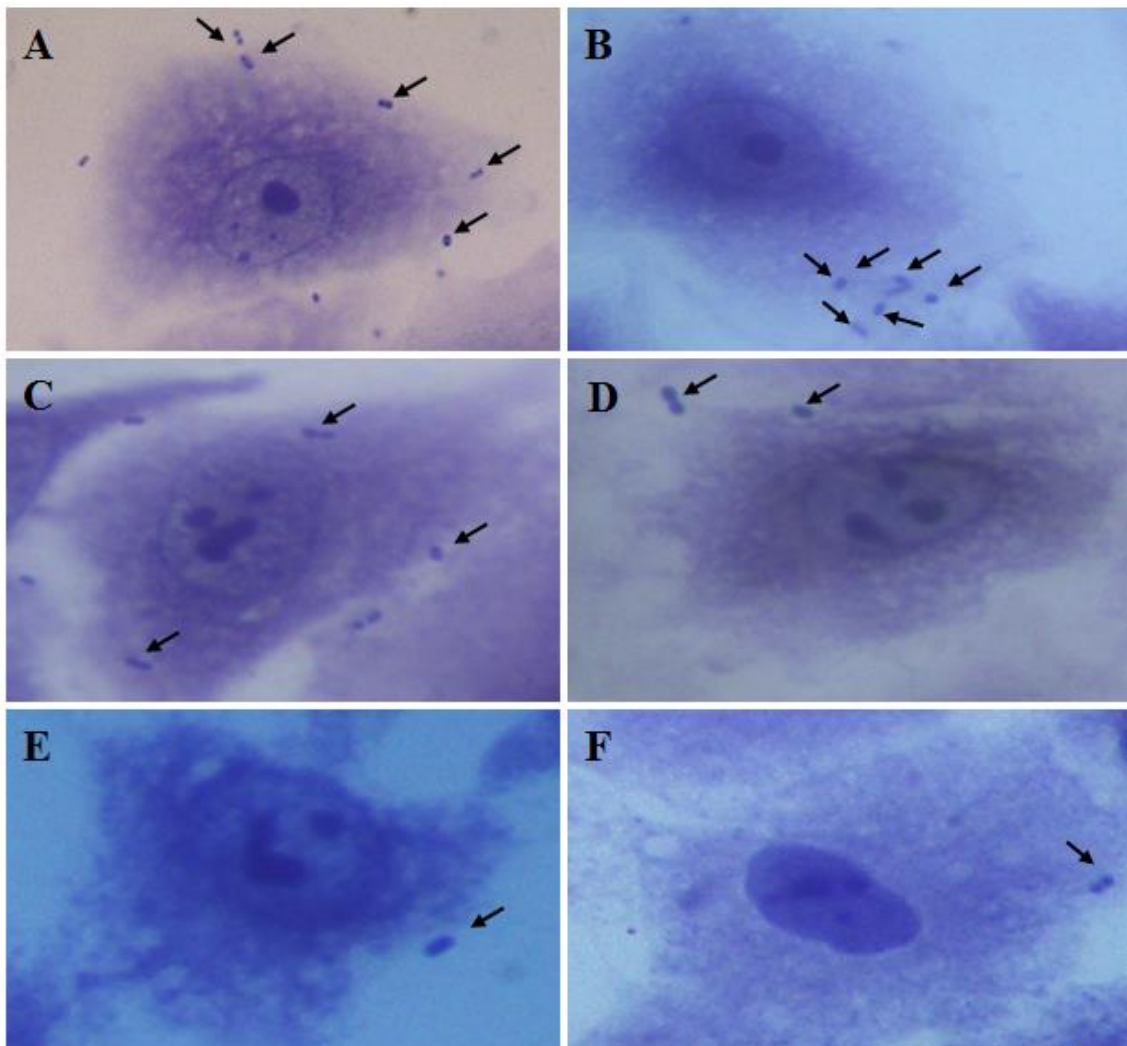


**Legenda:** Ab, *Acinetobacter baumannii*.

**Figura 10.** Células A-549 infectadas por 2 h com *A. baumannii* ATCC 19606 fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x. As setas indicam as células bacterianas.



**Figura 11.** Células A-549 infectadas por 2 h com *A. baumannii* fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.

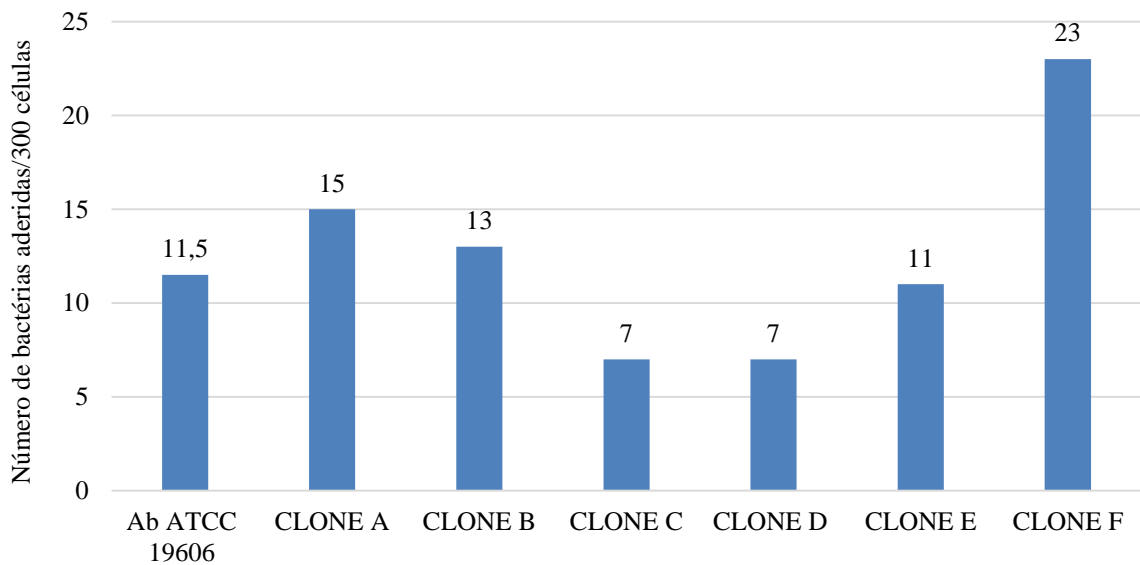


**Legenda:** (A) Clone A, (B) Clone B, (C) Clone C, (D) Clone D, (E) Clone E e (F) Clone F.

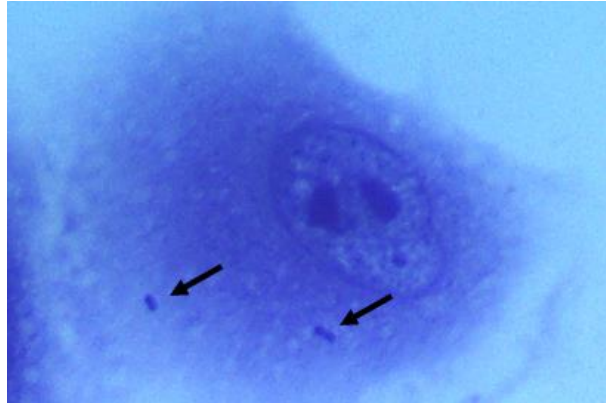
No ensaio de associação às células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2), também foi possível evidenciar a adesão da cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 (**Figura 13**) e dos isolados selecionados, representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) (**Figura 14**).

Já a mediana das contagens do número total de bactérias/300 células HEp-2, variou entre 7 e 23 para os 6 isolados de *A. baumannii* analisados e foi de 11,5 para a cepa ATCC 19606. O isolado representante do clone A, apresentou 15 bactérias/300 células, o isolado do clone B, 13 bactérias/300 células, o isolado do clone C, 7 bactérias/300 células, o isolado representante do clone D, 7 bactérias/300 células, o isolado do clone E, 11 bactérias/300 células, e o isolado do clone F, apresentou 23 bactérias/300 células (**Figura 12**).

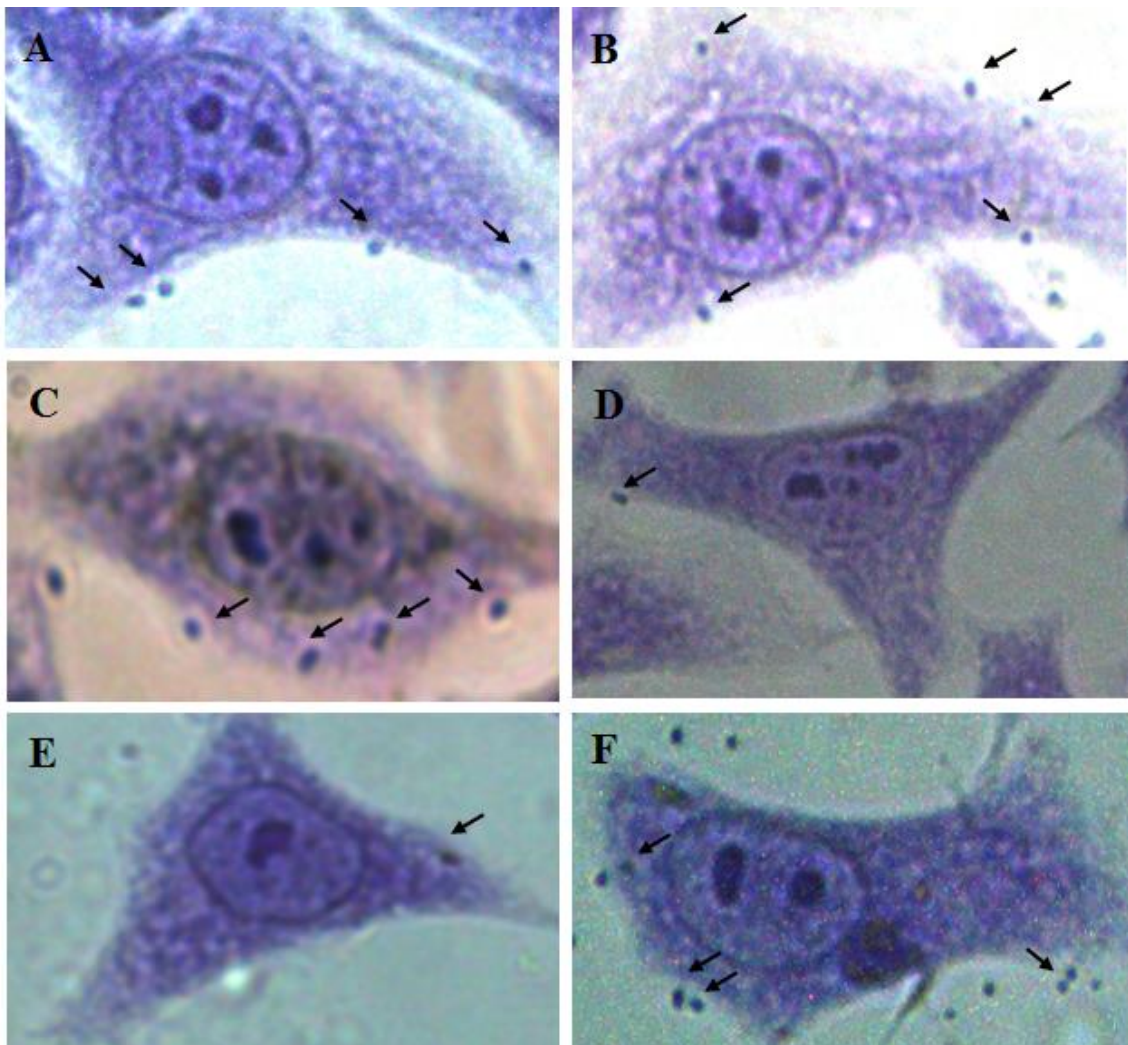
**Figura 12.** Grau de associação dos isolados de *A. baumannii* às células HEp-2 após 2 h de infecção. Os resultados estão apresentados através do cálculo da mediana das leituras referentes ao número de bactérias aderidas por 300 células visualizadas.



**Figura 13.** Células HEp-2 infectadas por 2 h com *A. baumannii* ATCC 19606 fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.



**Figura 14.** Células HEp-2 infectadas por 2 h com *A. baumannii* coradas fotografadas no microscópio óptico em um aumento de 40x.



**Legenda:** (A) Clone A, (B) Clone B, (C) Clone C, (D) Clone D, (E) Clone E e (F) Clone F.



Foi realizada a análise estatística das contagens obtidas pela microscopia óptica pelo teste de *Mann Whitney* para comparar o grau de associação da cepa ATCC 19606 às células A-549 com o grau de associação dos isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) a essas células. A mesma análise foi realizada para comparar o grau de associação da cepa ATCC 19606 com o grau de associação dos isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) às células HEP-2.

Na avaliação da associação das bactérias às células A-549, foi possível observar que o grau de associação do isolado do clone A e do clone F a essas células foi significativamente menor que o grau de associação da cepa *A. baumannii* ATCC 19606. Não houve diferença significativa no grau de associação dos outros isolados (representantes do clone B, C, D e E) às células A-549 comparados com a cepa de referência.

Já na avaliação da associação das bactérias às células HEP-2, foi possível observar que o grau de associação do isolado do clone C e D a essas células foi significativamente menor que a associação da cepa *A. baumannii* ATCC 19606. Porém o grau de associação do isolado do clone F essas células foi significativamente maior que o grau de associação da cepa *A. baumannii* ATCC 19606. Não houve diferença significativa no grau de associação dos outros isolados (representantes do clone A, B e E) às células HEP-2 comparados com a cepa de referência.

Pelo mesmo teste estatístico, comparamos o grau de associação dos isolados representantes de cada clone às duas células estudadas (A-549 e HEP-2). Nessa avaliação observamos que houve um grau de associação significativamente maior às células HEP-2 dos isolados representantes dos clones A, B, E e F comparada com a associação desses isolados às células A-549. Para os outros isolados (representantes do clone C e D) não houve diferença significativa entre o grau de associação às células HEP-2 e A-549.

Por conta dos resultados obtidos pela análise estatística, os demais ensaios foram realizados apenas com a linhagem celular HEP-2.

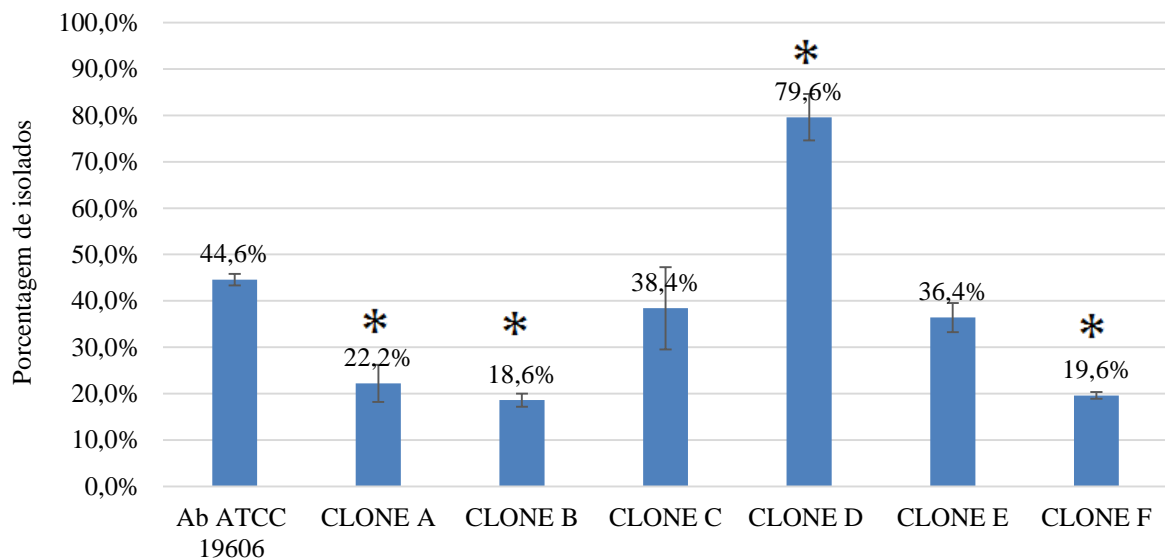
No ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) com a célula HEP-2, avaliamos o grau de associação dos isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F), da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e *Y. enterocolitica* O:3 após 2 h de infecção. Esse ensaio foi realizado para avaliar a capacidade dos isolados invadirem a célula humana, já que foi utilizada a polimixina B (250 µg/mL) para matar todas as bactérias extracelulares. Somente os isolados capazes de invadir as células seriam capazes de crescer no Agar MacConkey após o plaqueamento das diluições sucessivas.

Após o plaqueamento, observamos que somente a cepa de *Y. enterocolitica* O:3, utilizada como controle positivo para invasão bacteriana, foi capaz de crescer na placa de Agar MacConkey. A cepa de *Y. enterocolitica* apresentou  $0,5 \times 10^3$  UFC/mL. Esse resultado sugere que os isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) e a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 não são capazes de invadir células humanas.

A avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT) foi realizada para quantificar as células HEp-2 viáveis que são capazes de metabolizar o MTT (MOSMANN, 1983).

A linhagem celular HEp-2 quando infectada com os isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F) e a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 apresentou uma porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, que possuía apenas as células não infectadas. Nesse controle foi considerado que a viabilidade das células HEp-2 era de 100%. As células infectadas com a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 apresentaram 44,6% de viabilidade, as células infectadas com os isolados representativo do clone A, B, C, D, E e F apresentaram 22,2%, 18,6%, 38,4%, 79,6%, 36,4% e 19,6% de viabilidade celular, respectivamente (**Figura 15**).

**Figura 15.** Porcentagem de viabilidade celular das células HEp-2 infectadas com a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e com os isolados representantes de cada clone testado através do ensaio de avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT).



**Legenda:** \* , porcentagens significativamente diferentes.

Foi realizada a análise estatística das porcentagens de viabilidade celular das células HEp-2 pelo teste *t student*, para comparar a viabilidade celular da célula HEp-2 após infecção pela cepa *A. baumannii* ATCC 19606 com a viabilidade celular da HEp-2 após infecção pelos isolados representantes de cada clone (A, B, C, D, E e F).

Observamos diferenças significativas na avaliação nos isolados representantes dos clones A, B, D e F. Após a infecção da célula HEp-2 pelos isolados dos clones A, B e F, observamos uma diminuição significativa na porcentagem de viabilidade das células HEp-2 comparada com a porcentagem de viabilidade das células HEp-2 após infecção pela cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. Após a infecção da célula HEp-2 pelo isolado do clone D, observamos um aumento significativo na porcentagem de viabilidade das células HEp-2 comparada com a porcentagem de viabilidade das células HEp-2 após infecção pela cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606.

## 5 DISCUSSÃO

O gênero *Acinetobacter* é comumente associado a infecções hospitalares ou IRAS, principalmente em países em desenvolvimento (BAUMGART; MOLINARI; SILVEIRA, 2010, CIESLINSKI et al, 2013). A espécie *A. baumannii* começou a ser um grande problema na década de 1990 e com o passar dos anos, esse micro-organismo tornou-se um importante agente causador de IRAS no mundo (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008) e o mais frequentemente associado com pneumonia e infecções de cateter em alguns hospitais públicos e privados (TOLEDO et al, 2012). A manutenção de *A. baumannii* no ambiente hospitalar, tem sido atribuído a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos e sobrevivência por longos períodos em superfícies e equipamentos médicos, mas também a sua associação com transmissão pessoa-a-pessoa (PILONETTO et al, 2004, JOLY-GUILLOU, 2005, RAKA et al, 2009, MEDELL et al, 2012). Por este motivo, o estudo de isolados de *A. baumannii* coletados de ambiente hospitalar bem como seus mecanismos de resistência e virulência são de grande importância, já que esse micro-organismo está associado a diversos surtos no Brasil e no mundo (YOUNG; SABEL; PRICE, 2007, VALENZUELA et al, 2007, VALENTINE et al, 2008).

Nosso estudo teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana, polimorfismo genético e alguns fatores de virulência em isolados de *A. baumannii* coletados de dois hospitais públicos do município do Rio de Janeiro, por um período de um ano (abril de 2010 a abril de 2011).

Os 92 isolados foram previamente identificados por testes fenotípicos através do sistema automatizado Vitek 2 como pertencente ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*. Para confirmar a identificação dos isolados, foram realizados testes fenotípicos adicionais e métodos moleculares. Como resultado dessa primeira identificação por testes bioquímicos, todos os isolados foram pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, e com a identificação molecular, confirmamos a identificação desses isolados como *A. baumannii*. A identificação molecular a nível de espécie, foi realizada através da amplificação por PCR e sequenciamento do gene *rpoB* (LA SCOLA et al, 2004).

A identificação a nível de espécie dentro do gênero *Acinetobacter* é muitas vezes problemática. Atualmente as espécies de *Acinetobacter* são identificadas por métodos moleculares (KARAH et al, 2011, AHMED; ALP, 2015), dentre eles, o sequenciamento do gene codificador do RNA ribossômico da subunidade 16S (*16S rRNA*), sendo esse um dos

mais utilizados para identificação bacteriana (CUSTOVIC et al, 2014). Porém sua principal limitação se deve ao fato desse gene ser tão conservado, que não possibilita, no caso de *Acinetobacter*, diferenciar todas as espécies (ALVAREZ-BUYLLA; CULEBRAS; PICAZO, 2012). Outros genes que codificam proteínas, incluindo os genes, *ompA*, *recA*, *gyrB* e *rpoB*, recentemente, têm sido utilizados para a identificação de isolados de *Acinetobacter* spp. Entre eles, o gene *rpoB*, que foi utilizado em nosso estudo, permite diferenciar a maioria das espécies desse micro-organismo (GUNDI et al, 2009, KARAH et al, 2011, McCONNELL et al, 2012, WANG et al, 2014, NAJAR PEERAYEH; KARMOSTAJI, 2015).

Além desses, também existem outros métodos moleculares para identificação das espécies de *Acinetobacter*, dentre eles a técnica de AFLP, que se baseia na digestão do DNA por duas enzimas de restrição e posterior amplificação dos fragmentos pelo uso de adaptadores aos fragmentos obtidos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007); e a técnica *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), que se baseia na análise dos fragmentos de restrição obtidos a partir da restrição enzimática do produto resultante da amplificação do DNA codificador do RNA ribossômico da subunidade 16S (DIJKSHOORN et al, 1998). Porém alguns desses métodos ainda apresentam desvantagens devido a dificuldades de padronização dos resultados, que não podem ser comparados entre laboratórios, pois além de serem trabalhosas, como por exemplo na técnica ARDRA, pode ser observada a ocorrência de múltiplos perfis entre diferentes isolados pertencentes à mesma espécie (DIJKSHOORN et al, 1998, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007, PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Na avaliação o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* estudados, observamos que 93,5% dos isolados de *A. baumannii* apresentaram perfil MDR e 6,5% apresentaram perfil não multirresistente (n-MDR), nenhum se mostrou panresistente. Além disso dentre os antimicrobianos testados, verificamos altos percentuais de resistência aos diversos antimicrobianos como cefotaxima (94,6%), piperacilina/tazobactam (92,4%), ciprofloxacina e cefepima (90,2%), imipenem e meropenem (87%), ceftazidima (83,4%). ampicilina/sulbactam (82,6%).

O uso extensivo de antimicrobianos no ambiente hospitalar tem levado ao rápido aparecimento de isolados de *A. baumannii* MDR (PEREZ et al, 2007). Este fenômeno de micro-organismos MDR tem se tornado um motivo de grande preocupação em infecções causadas por *A. baumannii* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Em um estudo com isolados coletados na Ásia, Europa, América Latina e América do Norte entre 2001 e 2004, observou-se que aqueles coletados na América Latina apresentaram

os maiores percentuais de resistência à ciprofloxacina e às cefalosporinas de amplo espectro, assim como observado em nosso estudo. Nesse mesmo estudo foram relatados numerosos isolados de *A. baumannii* PDR em hospitais asiáticos e do Oriente Médio. As taxas de resistência dos isolados nesses locais, durante os anos de 2001 e 2004, ultrapassaram 25% para imipenem e meropenem, 40% para cefepima e ceftazidima, 40% para ampicilina-sulbactam e 45% para ciprofloxacina (GALES; JONES; SADER, 2006).

A partir dos isolados coletados no Canadá durante 2009 e 2010, apenas 2,7% dos isolados apresentaram resistência aos carbapenemas (MATASEJE et al, 2012). Já em um estudo incluindo isolados de *Acinetobacter* coletados entre 2004 e 2005 de 76 centros nos Estados Unidos, 39,8% foram resistentes ao imipenem (HALSTEAD; ABID; DOWZICKY, 2007). Na Grécia e em Israel foi observado um aumento da resistência ao imipenem. Na Grécia, a proporção de isolados *A. baumannii* resistentes ao imipenem, coletados de pacientes hospitalizados entre 1996 e 2007 em hospitais terciários em várias regiões do país, subiu de 0% para 85,1% em UTIs, 60,4% enfermarias e 59% enfermarias cirúrgicas (SOULI et al, 2006). Em Israel foi demonstrado que a resistência de *A. baumannii* ao imipenem também aumentou, já que em 1990, 2% dos isolados eram resistentes e 10 anos depois foi observado resistência em 50% dos isolados. Ainda nesse estudo foi constatado que cerca de 10% de isolados desse micro-organismo eram MDR (SMOLYAKOV et al, 2003).

As taxas de resistência ao imipenem, ao meropenem, à ceftazidima, à piperacilina/tazobactam, à ciprofloxacina e à gentamicina na América Latina parecem estar entre as maiores do mundo (UNAL; RODRIGUEZ GARCIA, 2005). Foi observado que na América Latina, as taxas de resistência de *Acinetobacter* ao imipenem aumentaram cerca de 60% em um período de 13 anos na Argentina, no Chile e no Brasil (GALES et al, 2012).

Para *A. baumannii*, foi observada resistência de 86% ao imipenem durante os anos de 2001-2004 na América Latina (GALES; JONES; SADER, 2006), uma porcentagem que se aproxima da observada no presente estudo em isolados coletado nos anos de 2010 e 2011 (87%).

Em estudos mais antigos com isolados provenientes de estados brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) foi observada apenas aproximadamente 10% de resistência aos carbapenemas (SADER et al, 2001).

Mais recentemente, um estudo conduzido no Paraná investigou o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *A. baumannii* coletados de pacientes e do ambiente hospitalar, em dois períodos diferentes (1994-1996 e 2004-2007). Como resultado foi detectado um aumento da resistência aos carbapenemas de 2% para 73% (VIANA et al,

2011). A partir desses resultados é possível observar o aumento da resistência ao imipenem e meropenem. Comparando os nossos resultados do perfil de suscetibilidade aos outros antimicrobianos testados com os obtidos no estudo de VIANA et al (2011), verificamos altos níveis de resistência em ambos os trabalhos para piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e ampicilina/sulbactam (VIANA et al, 2011).

Um estudo de 2014, com isolados coletados em vários estados brasileiros observou que todos os isolados estudados eram MDR. Nesse mesmo estudo mais de 80% dos isolados possuíam resistência aos seguintes antimicrobianos, ciprofloxacina, cefepima, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, ampicilina / sulbactam, além de imipenem e meropenem. Para amicacina foi observado maior suscetibilidade, assim como observamos no presente estudo (CHAGAS et al, 2014).

Outro trabalho realizado no Brasil, também observou altos níveis de resistência à piperacilina/tazobactam, à ciprofloxacina, à cefepima, à ampicilina/sulbactam, ao imipenem e meropenem (CORTIVO et al, 2015).

O aumento da resistência aos antimicrobianos, tem levado ao uso de associações de diferentes agentes antimicrobianos como colistina e rifampicina, imipenem e rifampicina, imipenem e tobramicina, tobramicina e rifampicina, na tentativa de cura dos pacientes, porém em muitos casos esgotam-se todas as opções de tratamento. A ausência de tratamentos eficazes para infecções causadas por *A. baumannii* tem limitado o tratamento muitas vezes ao uso de antimicrobianos não mais utilizados, como polimixina B e polimixina E (colistina), que são antimicrobianos sintéticos que apresentam efeitos colaterais nocivos aos pacientes, como ação nefrotóxica (MARAGAKIS; PERL, 2008).

Em nosso trabalho foi avaliado a CIM da polimixina B frente aos isolados de *A. baumannii*. Dentre eles, apenas 18,5% foram suscetíveis à polimixina B. A maioria dos isolados foi resistente à polimixina B, apresentando valores de CIM entre 4-64 µg/mL.

Nossos resultados diferem de alguns estudos realizados no Irã e México, que mostram isolados com 100% de suscetibilidade à polimixina B (PLERAYEH; KARMOSTAJI, 2015). Em alguns estudos a polimixina B foi o único antimicrobiano que mostrou eficácia frente a *A. baumannii* (TOGNIM et al, 2004, VIANA et al, 2011, LIU et al, 2014). Além disso, em isolados coletados na América Latina em 2001, esse antimicrobiano, apresentou excelente atividade, já que 96,4% dos isolados eram suscetíveis a esse antimicrobiano. Nesse estudo, apenas seis isolados foram categorizados como resistentes à polimixina, eles eram provenientes de três hospitais brasileiros diferentes e apenas um deles também era resistente aos carbapenemas (TOGNIM et al, 2004).

Apesar desses relatos de alta suscetibilidade de isolados à polimixinas, nos últimos anos o uso intensivo das polimixinas tem levado a seleção de isolados de *A. baumannii* resistentes a esses antimicrobianos, já tendo sido relatados taxas de resistência de 40,7% na Espanha e 30,6% na Coreia (KO et al, 2007, ARROYO et al, 2009). Mais recentemente, isolados de *A. baumannii* resistentes à polimixina também foram recuperadas no Irã e nos EUA (BAHADOR et al, 2013, LESHU et al, 2013). Alguns estudos já previam o aumento da resistência à polimixina, como foi observado em nosso trabalho, Rolain et al (2011) afirmaram que as taxas de resistência aumentariam assim que o uso desse antimicrobiano se tornasse mais comum, como por exemplo no tratamento de infecção causadas por *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas, levando ao desenvolvimento de resistência por adaptação à pressão seletiva exercida pelo antimicrobiano (BARIN et al, 2013).

Fica evidente que o uso racional de antimicrobianos é fundamental para evitar surtos de *A. baumannii* MDR, já que a emergência destas espécies normalmente está associada à pressão seletiva do uso prolongado de antimicrobianos de amplo espectro (MAK et al, 2009). Os carbapenemas ainda estão entre as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, porém o aumento do número de relatos da resistência desse micro-organismo a estes antimicrobianos, tem se tornado uma grande preocupação na comunidade médica (PEREZ et al, 2007, NICASIO; KUTI; NICOLAU, 2008). Como alternativa ao uso dos carbapenemas, as polimixinas (B e E) têm sido utilizadas para o tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* MDR. Mesmo com relatos de isolados desse patógeno resistente a esses antimicrobianos, as polimixinas têm sido consideradas a opção terapêutica mais eficaz contra isolados de *A. baumannii* MDR (POGUE; COHEN; MARCHAIM, 2015).

Como já foi descrito, mesmo com o crescente aparecimento de isolados resistentes aos carbapenemas, esses antimicrobianos ainda são uma opção de escolha no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR. Entre esses antimicrobianos, o imipenem é considerado mais potente no tratamento dessas infecções do que o meropenem. A resistência ao imipenem está mais associada à expressão de enzimas oxacilinasas, enquanto que a resistência ao meropenem, à expressão de bombas de efluxo (IKONOMIDIS et al, 2006). A porcentagem de resistência ao imipenem e meropenem nos isolados estudados foi igual, porém nesse estudo não verificamos a expressão de bombas de efluxo, nós apenas detectamos a presença dos genes que codificam as enzimas oxacilinasas.

No nosso trabalho, pesquisamos nos isolados de *A. baumannii* os seguintes genes codificadores de OXA: *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>. Após a PCR,



observamos a presença do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> em todas os isolados e do gene *bla*<sub>OXA-23like</sub> em 93,5% dos isolados. Os genes relativos as outras OXA pesquisadas não foram detectadas em nenhum isolado. Estudos anteriores relataram que além do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, intrínseco em *A. baumannii*, o *bla*<sub>OXA-23</sub> é o mais comumente detectado nesse micro-organismo (KUSRADZE et al, 2011)

Atualmente, nove principais subgrupos de OXA são descritos (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Em *A. baumannii*, 6 subgrupos filogenéticos dessas enzimas já foram descritos (OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235), 4 desses subgrupos são predominantes, incluindo OXA-23, OXA-24/40, OXA-51 e OXA-58-like (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006, POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010, HIGGINS, 2013). Esses genes podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos, além disso, podem estar associados com estruturas genéticas, como por exemplo transposons (MUGNIER et al, 2010).

O gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, foi identificado pela primeira vez em isolados de *A. baumannii* coletados na Argentina em 1996 (BROWN; YOUNG; AMYES 2005). Esse gene é intrínseco nesses micro-organismos e é naturalmente encontrado no cromossoma dessa espécie. O subgrupo de enzimas OXA-51 possui grande número de variantes, isso é uma indicação de que os isolados que possuem os genes que as codificam, têm sofrido pressão seletiva considerável por conta do uso de antimicrobianos, essas enzimas desempenham um papel relevante na resistência aos carbapenemas (EVANS; AMYES, 2014).

Novos subgrupos filogenéticos de OXA têm sido frequentemente descobertos desde a primeira descrição e caracterização de isolados de *A. baumannii* com OXA-23 (PATON et al, 1993, POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> tem sido descrito em todo o mundo (MUGNIER et al, 2010) e de acordo com alguns estudos, a propagação desse gene pode ser devido a elementos móveis (isto é, plasmídeos, *transposons*, sequência de inserção) (GROSSO et al, 2011, CLÍMACO et al, 2013). Entre os países que têm relatado isolados de *A. baumannii* que possuem carbapenemases do tipo OXA-23 estão, França (CORVEC et al, 2007), Alemanha (KOHLENBERG et al, 2009), Bulgária (STOEVA et al 2009), Roménia (BONNIN et al, 2011b), os Estados Unidos (ADAMS et al, 2008), Austrália (VALENZUELA et al, 2007), Taiwan (LIN et al, 2011), China (LI et al, 2014), Coreia (LEE et al, 2011), Singapura (KOH et al, 2007), Itália (PRINCIPE et al, 2014), Espanha (MOSQUEDA et al, 2013), Colômbia (MARTÍNEZ; MATTAR, 2012) e o Brasil (CHAGAS et al, 2014). Em geral, a detecção do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> nos isolados do nosso trabalho foi maior do que os

resultados encontrados por outros estudos no exterior (LEE et al, 2013, MAMMINA et al, 2011, LIAKOPOULOS et al, 2012, BONNIN et al, 2011b, HAMMAMI et al, 2011).

No Brasil, o primeiro relato da enzima OXA-23 em isolados de *A. baumannii* resistente aos carbapenemas, ocorreu em 2003 (DALLA-COSTA et al, 2003). Após esse relato, o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> começou a ser descrito em outros trabalhos. A presença desse gene nos isolados brasileiros de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas variou de 62% a 99% (FERREIRA et al, 2011, FURTADO et al 2011, MARTINS et al, 2013). Um estudo realizado em Porto Alegre avaliou dados clínicos e epidemiológicos de infecções por *A. baumannii* MDR, durante um ano, em 99% dos isolados foi identificado o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (MARTINS et al, 2013). Outro estudo brasileiro analisou as características genotípicas de isolados de *A. baumannii* de oito hospitais no Estado do Paraná e relatou que todos os isolados abrigaram o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (CIELINSKI et al, 2013). Já em isolados coletados de hospitais do Rio de Janeiro, observou-se a presença desse gene em 87% dos isolados (CARVALHO et al, 2009). Em nosso estudo também observamos a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> na maioria dos isolados de *A. baumannii* estudados (93,5%).

Em nosso estudo, também observamos que os isolados resistentes ou não aos carbapenemas, que possuíam o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (93,5%) estavam agrupados nos dois clones prevalentes (A e B) e na maioria dos clones esporádicos (C, D, E, F, G, I, K, L, N, O, P, T, U). Diferente de um estudo realizado na cidade de Curitiba, em 2010, que verificou a presença de apenas três clones distintos que agrupavam isolados de *A. baumannii* com o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, sendo um deles genotipicamente semelhante ao primeiro clone identificado em 1999, que persistiu no mesmo hospital até abril de 2004. Então, foi sugerido que a transferência horizontal desse fator de resistência era codificada por um gene primordialmente plasmidial, que desempenhou um papel importante na disseminação do mesmo (SCHIMITH-BIER et al, 2010).

Outros genes que codificam carbapenemases do tipo OXA já foram descritos em isolados de *A. baumannii* em todo mundo, incluindo o Brasil. As enzimas *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> (*bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-25</sub>, *bla*<sub>OXA-26</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub> e *bla*<sub>OXA-72</sub>) compartilham 60% de homologia com os aminoácidos das enzimas OXA-23-like (ZAVASCKI et al, 2010). As primeiras enzimas deste grupo foram originalmente descritas em isolados de *A. baumannii* coletados na Península Ibérica e, por um tempo, ficaram restritos a Europa e EUA, sem relatos no Brasil até 2011 (ANTONIO et al, 2011, WERNECK et al, 2011, ZAVASCKI et al, 2010). Apenas o gene *bla*<sub>OXA-72</sub>, do grupo de enzimas OXA-24-like, foi descrito em isolados no Brasil (de SÁ CAVALCANTI et al, 2013, WERNECK et al, 2011).

Os genes *bla*<sub>OXA-58-like</sub> foram identificados mais recentemente, são frequentemente mediados por plasmídeos, e já foram descritos em isolados que causaram surtos hospitalares em UTIs de todo o mundo. Além disso, são normalmente detectados em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas, porém já foram encontrados em isolados suscetíveis (ZARRILLI et al, 2013). No Brasil, existem apenas 2 relatos da detecção desse gene (FIGUEIREDO et al, 2011, de SOUZA GUSATTI et al, 2012). A enzima OXA-143 compartilha 88% de homologia com os aminoácidos das enzimas OXA-24-like, estudos relatam que essa enzima mostra níveis baixos de hidrólise de carbapenemas, porém já foi demonstrado que quando o gene *bla*<sub>OXA-143</sub> é transferido para isolados suscetíveis, há um aumento nos níveis de resistência aos carbapenemas (HIGGINS et al, 2009). Esse gene até o momento, foi relatado apenas no Brasil e ainda há poucos relatos sobre a presença desse gene em isolados de *A. baumannii* (HIGGINS et al, 2009, ANTONIO et al, 2011, GIRLICH et al 2014).

Alguns estudos têm demonstrado a ocorrência de mais de uma enzima do tipo OXA presentes em um mesmo isolado (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008, MENDES et al, 2009). Em nosso estudo isso foi evidenciado em 92,3% isolados.

Após a análise dos isolados resistentes aos carbapenemas, foi evidenciado que alguns deles não possuíam o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, por isso, sugerimos que essa resistência seja mediada pelo gene *bla*<sub>OXA-51</sub> (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Este gene normalmente é pouco expresso, porém, a presença da sequência de inserção *ISAbal* ou *ISAb9* pode favorecer o aumento de sua expressão. Além do mais, outros mecanismos, como alteração de permeabilidade da membrana ou hiperexpressão de bombas de efluxo também podem conferir resistência aos carbapenemas (TURTON et al, 2006b, FIGUEIREDO et al, 2009a, FIGUEIREDO et al, 2009b). No entanto, a detecção deste gene foi utilizada somente para identificação de *A. baumannii* e sua associação a sequências de inserção não foi avaliada ainda.

Com relação a presença do gene da sequência de inserção *ISAbal* nos isolados de *A. baumannii* estudados, observamos que esse gene estava presente em todos os isolados. Já dentre os 80 isolados com resistência aos carbapenemas, 97,5% tiveram a presença confirmada dos dois genes codificadores de oxacilinasas, *bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub>, além da sequência de inserção *ISAbal*. Em apenas 2 isolados MDR, resistente aos carbapenemas, não foi detectado o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>.

Em nosso estudo foi verificada a importante correlação entre a presença dos dois genes codificadores de oxacilinasas (*bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub>) e *ISAbal*. Esta combinação pode

ser um dos principais mecanismos de resistência que a espécie *A. baumannii* possui, já que entre os 92 isolados estudados, 92,4% possuíam essa combinação e todos apresentaram perfil de multirresistência a vários agentes antimicrobianos.

As sequências de inserção (SI) desempenham um papel importante na mobilização e expressão das enzimas do tipo OXA. Isto é particularmente evidente em espécies de *Acinetobacter*, em que sequências de inserção são frequentemente identificadas em associação com um gene *bla*<sub>OXA</sub>. A SI mais prevalente em *Acinetobacter* é a *ISAbal*. Em *A. baumannii*, a primeira descrição de *ISAbal* foi em 2003 (CORVEC et al, 2003), apesar da identificação já ter ocorrido em outros micro-organismos (SEGAL; THOMAS; ELISHA, 2003). Os genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-51-like</sub> podem ter sua expressão aumentada quando associados com a essa sequência de inserção porque ela funciona como uma região promotora para ambos os genes (RUIZ et al, 2007).

Assim como nós observamos a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> em isolados suscetíveis ao imipenem e meropenem (41,6%), um estudo de 2011, também com isolados coletados no Rio de Janeiro, observou esse mesmo resultado (CARVALHO et al, 2011). Porém como nós não pesquisamos a associação entre os genes *bla*<sub>OXA-23</sub> e *ISAbal*, essa suscetibilidade possa ocorrer devido a ausência de associação entre esses dois genes, como foi descrito por Carvalho et al (2011).

Estudos revelam a presença dos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> em *A. radioresistens* suscetíveis aos carbapenemas, nesses micro-organismos esses genes são codificados por cromossomos, sugerindo que esta espécie possa ser uma fonte destes genes (BOO; CROWLEY, 2009, MENDES et al, 2009).

Esses resultados forneceram evidências de que o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> possa se disseminar silenciosamente no ambiente hospitalar, a partir de “reservatórios” não detectados de genes codificadores de OXA. Os genes codificadores de carbapenemases não detectados são um desafio, uma vez que não é realizada pesquisa em um isolado suscetível da presença desses genes. As medidas de controle de infecções nos hospitais têm geralmente como alvo apenas os micro-organismos resistentes ao imipenem detectados em testes fenotípicos complementares. O futuro controle da multirresistência pode exigir a identificação de isolados MDR e seus reservatórios, utilizando métodos moleculares (CARVALHO et al, 2011).

A capacidade dos isolados de *A. baumannii* produzir biofilme foi estudada pelo ensaio colorimétrico de cristal violeta, que indiretamente mede o número de células bacterianas baseado na coloração da camada de peptidoglicano (MOSKOWITZ et al, 2004).

Observou-se que a maioria dos isolados estudados foi produtor de biofilme (79,3%), eles foram classificados em fortes, moderados e fracos produtores de biofilme. A formação de biofilme nesses isolados foi maior do que em alguns trabalhos, que demonstraram essa capacidade em aproximadamente 62% dos isolados estudados (RAO et al, 2008, RODRÍGUEZ-BAÑO et al, 2008, BADAVER; KULKARNI, 2015)

Assim como em nosso estudo, Rodríguez-Baño et al (2008) mostraram que a capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas é comum entre os isolados de *A. baumannii* e que um dos sítios mais frequentes de coleta desses isolados é relacionado ao cateter. Nesse mesmo estudo também foi observada maior formação de biofilme em isolados coletados de infecção da corrente sanguínea, esse dado difere dos encontrados em nosso estudo (RODRÍGUEZ-BAÑO et al, 2008).

Nós observamos que a maioria dos isolados multirresistentes formou biofilme, sendo essa característica encontrada em diversos estudos (RAO et al, 2008, MONIRI et al, 2010, GURUNG et al, 2013). Porém, assim como de Breij et al (2010), também observamos que os isolados MDR não formaram mais biofilme que os isolados suscetíveis. Vinte um por cento dos isolados estudados em nosso trabalho, que apresentaram multirresistência, não produziram biofilme. Em estudos que também investigaram a correlação entre biofilme e multirresistência, foi verificado que alguns isolados não produziram biofilme, apesar de serem MDR (RAO et al, 2008, RODRÍGUEZ-BAÑO et al, 2008).

Os isolados suscetíveis ao imipenem e meropenem apresentaram maior capacidade de produzir biofilme do que isolados resistentes (83,3% e 78,5%, respectivamente). Nossos resultados são corroborados com resultados de um estudo no qual foram encontrados isolados produtores e não produtores de biofilme dentre os isolados resistentes ao imipenem (RAO et al, 2008). Além disso, como em nossos resultados, um estudo verificou que a formação de biofilme foi maior nos isolados suscetíveis ao imipenem que nos resistentes (47% e 25%, respectivamente) (RODRÍGUEZ-BAÑO et al, 2008).

Houve uma grande variação na formação de biofilme entre os isolados de *A. baumannii*, porém não foi possível correlacionar maior formação de biofilme com os clones considerados predominantes, já que todos em todos os clones foi observada a presença de isolados apresentando essa característica. Outros estudos também não constataram maior capacidade na formação de biofilme nos isolados dos clones prevalentes, além disso a formação de biofilme não diferiu entre os clones de *A. baumannii* com maior ou menor prevalência (LEE et al, 2006). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a formação de

biofilme é específica do isolado e não do clone ao qual ele pertence, apenas esse recurso não conseguiria explicar o sucesso de *A. baumannii* em um hospedeiro suscetível.

Apesar do grande número de estudo envolvendo a associação entre *A. baumannii* com os surtos hospitalares, infecções graves e resistência aos antimicrobianos, fatores que determinam a virulência e patogenicidade deste micro-organismo precisam ser melhor elucidados. No entanto, torna-se evidente que a capacidade de formação de biofilme, além de outras características desse micro-organismo, pode ser considerada como importante fator de virulência comum a um grande número de isolados *A. baumannii* (RODRÍGUEZ-BAÑO et al, 2008, KING et al, 2009, EIJKELKAMP et al, 2011, GURUNG et al, 2013).

Ainda há poucos trabalhos que pesquisem e avaliem a associação ou adesão de *A. baumannii* às superfícies bióticas. A literatura apresenta apenas estudos envolvendo apenas a adesão desse micro-organismo a superfícies abióticas, como plásticos e vidros (TOMARAS et al, 2003; EIJKELKAMP et al, 2011). Porém é muito importante que se compreenda a interação desse patógeno a superfícies bióticas para que se possa melhor entender o processo infeccioso e patogenia de *A. baumannii*. A adesão bacteriana às células epiteliais é uma das etapas essenciais para a colonização e posterior infecção e pouco se sabe sobre a interação deste patógeno com essas células. Por conta disso, um dos nossos objetivos foi avaliar a adesão de 6 isolados de *A. baumannii* às células epiteliais A-549 e HEp-2. Foram selecionados os isolados representativos dos clones A (33677), B (34371), C (96734), D (99677), E (97506) e F (30654). Nossos isolados foram capazes de se associar a essas células epiteliais humanas e apresentando graus variados de associação de bactérias aderidas ou internalizadas por células. Através da análise realizada por microscopia óptica, sugerimos que as bactérias estavam aderidas às células e não internalizadas. A adesão de *A. baumannii* a diferentes tipos de células respiratórias humanas já foi demonstrada em alguns estudos, indicando que este patógeno interage com os diferentes componentes do aparelho respiratório humano (LEE et al, 2006, LEE et al, 2008).

Os isolados foram escolhidos aleatoriamente, sendo que todos foram classificados como MDR e apresentavam resistência ao imipenem e meropenem; Além disso, 2 isolados, (34371, clone B) e (30654, clone F) eram suscetíveis a polimixina B. Por fim, todos os isolados também foram capazes de produzir biofilme, sendo quatro classificados como fortes produtores de biofilme e os outros dois classificados como moderado produtor de biofilme (30654, clone F) e fraco produtor de biofilme (33677, clone A).

Primeiramente foi avaliado nesse estudo, o grau de associação dos isolados à célula A-549 por microscopia óptica, essa célula é comumente utilizada para simular a adesão ao

pulmão humano e assim, representa um modelo potencial para pneumonia causada por *A. baumannii* (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009). Como resultado, não observamos um aumento significativo na associação dos isolados representantes dos clones prevalentes A e B às células A-549. Pelo contrário, o isolado representativo do clone A apresentou uma associação significativamente menor às células que a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. Nessa avaliação nenhum isolado apresentou uma associação significativamente maior às células A-549 que a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 (GIANNOULI et al, 2013).

Também avaliamos o grau de associação dos isolados à célula HEp-2 por microscopia ótica, e como resultado observamos um aumento significativo na associação do isolado do clone F às células HEp-2 comparado com a associação à cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. Além disso, também observamos uma diminuição significativa na associação dos isolados dos clones C e D às células HEp-2 quando comparado com a cepa *A. baumannii* ATCC 19606. Os demais isolados, representante dos clones A, B e E, não apresentaram grau de associação significativamente diferente da associação observada pela cepa *A. baumannii* ATCC 19606. A partir desse resultado, é possível notar que apesar do isolado do clone F, não formar biofilme forte em microplacas de poliestireno, ele foi capaz de aderir melhor às células HEp-2. A não correlação da formação de biofilme em microplacas de poliestireno (superfície abiótica) com a adesão às células humanas (superfície biótica) indica que diferentes mecanismos estão envolvidos nestes processos de colonização.

O envolvimento de estruturas como pilus, frequentemente associada a formação de biofilme em superfícies abióticas, também não foram relacionadas à adesão de *A. baumannii* às células epiteliais (de BREIJ et al, 2009). Além disso, observamos que os isolados mais prevalentes não aderiram às células epiteliais, como já foi observado por Lee et al (2006).

O grau de associação dos isolados às células HEp-2, no geral, foi significativamente maior que a associação às células A-549, por conta disso, os demais ensaios foram realizados apenas pela infecção das células HEp-2.

Os resultados do ensaio de invasão bacteriana e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), sugerem que os isolados de *A. baumannii* não conseguem invadir a célula, já que após a adição de polimixina B (250 ug/mL) e plaqueamento não foi possível detectar as bactérias que conseguiram se internalizar. Diferente do que foi observado na cepa *Y. enterocolitica* O:3, após a adição de polimixina B e plaqueamento foi possível detectar as bactérias, sugerindo que o antimicrobiano não teve ação contra as células bacterianas porque

elas estavam no interior da célula HEp-2. Esses resultados são condizentes com as imagens observadas utilizando a microscopia óptica.

A partir desses dados também podemos sugerir que a infecção de células HEp-2 por *A. baumannii*, diferente da infecção por *Y. enterocolitica* O:3, conduz à morte apoptótica sem invasão do micro-organismo a essas células, uma evidência que está de acordo com os resultados obtidos após a infecção ou a incubação de *A. baumannii* ATCC 19606 com essas mesmas células (CHOI et al, 2005, RUMBO et al, 2014)

O ensaio da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT), é utilizado para avaliar a viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio. Esse método analisa quantitativamente a redução do sal de metiltetrazólio (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, presente nas mitocôndrias, com a formação de um produto final de cristais de formazan que são mensurados em espectrofotômetro a 590nm (MOSMANN, 1983). Avaliando resultados obtidos por esse ensaio, observamos dados condizentes com os observados na avaliação do grau de associação dos isolados às células HEp-2 por microscopia óptica. A infecção dessa célula com isolados pertencentes ao clone F, induziu uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade da célula HEp-2 comparada com a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. Já a infecção das células HEp-2 com o isolado pertencente ao clone D, induziu um aumento estatisticamente significativo na viabilidade da célula HEp-2 comparada com a cepa de referência. Porém através dessa avaliação foi observado que os clones A e B também induziram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade da célula HEp-2, o que não foi observado pela avaliação do grau de associação por microscopia óptica.

As infecções causadas por *A. baumannii* representam um grande problema de saúde pública, já que esse micro-organismo possui uma capacidade única de sobreviver no ambiente hospitalar e desenvolver resistência aos antimicrobianos. No Brasil e no mundo esse micro-organismo causa surtos hospitalares problemáticos e as infecções causadas por eles são um desafio terapêutico (FOURNIER; RICHET, 2006, GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008, CERQUEIRA; PELEG, 2011). Por conta desses motivos é essencial identificar, prevenir e controlar a disseminação dessas infecções e da resistência microbiana em serviços de saúde no Brasil. Informações como perfil de resistência microbiana e polimorfismo genético, obtidas nesse estudo, auxiliam na adoção de medidas de prevenção e controle dessas infecções. Porém, são necessários mais estudos que como o nosso, forneçam informações necessárias que ajudem às comissões de controle de infecção hospitalar e aos profissionais da área de saúde, prevenir ou reduzir a expansão dessas infecções.



## 6 CONCLUSÕES

- Utilizando testes bioquímicos foi possível confirmar a identificação do gênero dos isolados estudados. A identificação da espécie *Acinetobacter baumannii* foi realizada utilizando um método molecular através da amplificação por PCR e sequenciamento do gene *rpoB*;
- O principal sítio de coleta dos isolados oriundos do HUGG foi secreção traqueal (41,2%; n=7) e o dos isolados oriundos do HFSE foi urina (22,7%; n=17).
- A maioria dos isolados foi classificada como multirresistentes (MDR) (93,4%, n=86), sendo revelados altos níveis de resistência a maioria dos antimicrobianos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções por *A. baumannii*; dentre os isolados MDR, 93% (n=80) foram resistentes aos carbapenemas (imipenem e meropenem).
- Através da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina B, também observamos altas porcentagens de resistência (81,5%, n=75), isso limita cada vez mais as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*;
- A presença da sequência de inserção *ISAbal* e o do gene *bla<sub>OXA-51</sub>* foi detectada em todos os isolados de *A. baumannii*. Já o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* foi detectado em 93,5% (n=86) isolados, sugerindo que este seja o principal fator de resistência aos carbapenemas;
- Dentre os isolados de *A. baumannii*, o perfil de multirresistência e a presença dos dois genes que codificam resistência aos carbapenemas foi observada na maioria dos isolados (93,4%, n=86), isso pode estar relacionado com a transferência de genes de resistência no ambiente hospitalar;
- Observou-se através da análise do polimorfismo genético dos isolados de *A. baumannii* por PFGE, a presença de dois clones prevalentes (A e B), que juntos agruparam 48,9% (n=45) dos isolados e a presença de 20 clone esporádicos (C a U);
- Foram encontrados 12 clones distintos entre os isolados suscetíveis aos carbapenemas, sendo três deles (A, B e C) encontrados também entre os isolados resistentes;
- A maioria dos isolados incluídos no estudo (79,3%, n=73) foram produtores de biofilme;
- O grau de associação dos isolados de *A. baumannii* às células epiteliais de carcinoma laríngeo humano (HEp-2), no geral, foi maior do que o grau de associação às

células tumorais epiteliais alveolares humanas (A-549). Também foi possível observar que os isolados eram capazes de aderir às células A-549 e HEp-2;

- Através da avaliação do grau de associação à célula HEp-2 pelo ensaio de contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) verificamos que os isolados de *A. baumannii* são capazes de aderir e não invadir essas células;
- Os resultados obtidos através da avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal metiltetrazólio (MTT) são condizentes com os obtidos pela microscopia óptica.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.D. et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.190, n.24, p.8053-8064, 2008.
- ADAMS, M.D. et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.3628–3634, 2009
- ADAMS-HADUCH, J.M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. **J Clin Microbiol**, v.49, p.3849–3854, 2011.
- AHMED, S.S.; ALP, E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. **J Infect Dev Ctries**, v.9, n.4, p.347-354, 2015.
- ALONSO, A.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. **Int Microbiol**, v.7, p.181-191, 2004.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; CULEBRAS, E.; PICAZO, J.J. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? **Infect Genet Evol**, v.12, n.2, p.345-920, 2012.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.289, p.321-331, 1980.
- ANTONIO, C.S. et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*<sub>OXA-143</sub> gene in Brazilian hospitals. **Ant Ag Chem**, v.55, n.3, p.1322-1323, 2011.
- APPLEMAN, M.D. et al. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, n.4, p.1035-1040, 2000.
- ARROYO, L.A. et al. In vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- and pandrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.3, p.1295-1296, 2009.
- BADAVE, G.K.; KULKARNI D. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. **Clin Diagn Res**, doi:10.7860/JCDR/2015/11014.5398, 2015.
- BAHADOR, A. et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel international clonevariants. **Microb Drug Resist**, v.19, p.397–406, 2013.
- BARIN, J. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.12, p.15, 2013.

BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New treatment options against gram-negative organisms. **Crit Care**, v.15, n.2, p.215, 2011.

BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R.Y. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol**, v.95, p.1520-1541, 1968.

BAUMGART, A.M.; MOLINARI, M.A.; SILVEIRA, A.C. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.5 p.433-436, 2010.

BAYUGA, S. et al. Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again. **Heart Lung**, v.31, p.382-390, 2002.

BEACHEY, E.H. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **J Infect Dis**, v.14, p.325-345, 1981.

BERTINI, A. et al. Multicopy *bla*<sub>OXA-58</sub> gene as a source of high level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.2324-2328, 2007.

BOGAERTS, P. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene associated with IS<sub>Aba4</sub> in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.4205-4206, 2008.

BONNIN, R.A. et al. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.1, p.349-354, 2011a.

BONNIN, R.A. et al. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.10, p. 1524-1528, out. 2011b.

BOO, T.W.; CROWLEY, B. Detection of *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? **J Med Microbiol**, v. 58, p.839-841, 2009.

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 Iwoffii*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v.36, p.228-240, 1986.

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

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infect Immun**, v.80, n.1, 228-223, 2012.

BROWN, S.; YOUNG, H.K.; AMYES, S.G.B. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clin Microbiol Infect**, v.11, p.15–23, 2005.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p.271-276, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1211-1233, 1995.

CAMARENA, L. et al. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. **PLoS Pathog**, v.6, e1000834, 2010.

CARVALHO, K.R. et al. Dissemination of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.1, p.25-8, 2009.

CARVALHO, K.R. et al. Occurrence of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.4, p.505-506, 2011.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.570–573, 2008.

CDC. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004 (Reprinted from MMWR, vol 53, pg 1063-1066, 2004). **JAMA**, v.292, p.2964-2966, 2004.

CERQUEIRA, G.M.; PELEG, A.Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. **IUBMB Life**, v.63, p.1055-1060, 2011.

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

CHO, Y.J. et al. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.64, p.185–190, 2009.

CHOI, A. et al. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-b-1-6-N-acetyl glucosamine PNAG that is critical for biofilm formation. **J Bacteriol**, v.191, p.5953–5963, 2009.

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

CHOI, C.H. et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cell Microbiol**, v.7, n.8, p.1127-1138, 2005.

CIESLINSKI, J.M. et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.77, p.337-340, 2013.

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

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S25. Wayne, Pennsylvania: **CLSI**, 2015.

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

CORTIVO, G.D. et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.48, n.6, p.699-705, 2015.

CORVEC, S. et al. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.629–635, 2003.

CORVEC, S. et al. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.1530-1533, 2007.

COSTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

COYNE, S. et al. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.947–953, 2011.

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

DAI, T. et al. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.3929-3934, 2009.

DALLA-COSTA, L.M. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 3403-6, 2003.

DAMIER-PIOLLE, L. S. et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.557–562, 2008.

de BREIJ, A. et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Res Microbiol**, v.160, p.213-218, 2009.

de BREIJ, A. et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? **PLoS One**, v.20, n.5, e10732, 2010.

de Sá Cavalcanti, F.L. et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.77, n.3, p.250-251, 2013.

de SOUZA GUSATTI, C. et al. First occurrence of *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v.43, n.1, p.243-246, 2012.

DESCHAGHT, P. et al. Rapid genotyping of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD). **Res microbial**, v.162, p.386-392, 2011.

DI POPOLO, A. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. **Clin Microbiol Infect**, v.17, p.197–201, 2011.

DIJKSHOORN, L. et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. **Syst Appl Microbiol**, v.21, p.33-39, 1998.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v.5, p.939–951, 2007.

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

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.14, p.137-166, 1998.

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

EVANS, B.A. et al. Novel genetic context of multiple *bla*<sub>OXA-58</sub> genes in *Acinetobacter* genospecies 3. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.1586–1588, 2010.

EVANS, B.A.; AMYES, S.G. OXA  $\beta$ -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v.27, n.2, p.241-263, 2014.

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

FALAGAS, M.E.; KOLETZI, P.K.; BLIZIOTIS, I.A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v.55, p.1619-1629, 2006.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F. et al. Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.51, p.565–574, 2003.

FERREIRA, A.E. et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* spp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul. **Brazil Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.6, p.725-730, 2011.

FIGUEIREDO, D.Q. et al. First report of the *bla*<sub>OXA-58</sub> gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.3, p.368-370, 2011.

FIGUEIREDO, S. et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba*1-mediated overexpression of the natural *bla*<sub>OXA-66</sub> oxacillinase gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.2657-2659, 2009a.

FIGUEIREDO, S. et al. Overexpression of the naturally occurring *bla*<sub>OXA-51</sub> gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba*9. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.4045-4047, 2009b

FOURNIER, P.E. et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Gene**, v.1, n.1, e7, 2006.

FOURNIER, P.E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin Infect Dis**, v.42, n.5, p. 692-699, 2006.

FURTADO, G.H. et al. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. **Am J Infect Control**, v.39, n.8, p.706-708, 2011.

GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, v.4, n.3, p.273-278, 2009.

GADDY, J.A.; TOMARAS, P.A.; ACTIS, L.A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infect Immun**, v.77, n.8, p.3150–3160, 2009.

GALES, A.C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.73, n.4, p.354-360, 2012.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). **Clin Microbiol Infect**, v.12, p.315–321, 2006.



GALES, A.C. et al. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. **Microb Drug Resist**, v.10, n.4, p.286-291, 2004.

GARRITY, M. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2, The Proteobacteria, Part B: **The Gammaproteobacteria**, 2 ed. Springer, 2005.

GBAGUIDI-HAORE H. et al. Antibiotics involved in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria: a nationwide multilevel study suggests differences within antibiotic classes. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p.461-470, 2013.

GERNER-SMIDT, P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Clin Microbiol**, v.30, p.2680-2605, 1992.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents**, v.32, n.2, p.106-119, 2008.

GIANNOULI, M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.828-830, 2009.

GIANNOULI, M. et al. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. **BMC Infect Dis**, v.13, p.282, 2013.

GIRLICH, D. et al. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.5, p.2976-2978, 2014.

GROSSO, F. et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.62-65, 2011.

GUNDI, V.A. et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiol**, v.155, p.2333-2341, 2009.

GURUNG, J. et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian J Crit Care Med**, v.17, p.214-218, 2013.

GUSTEN, W.M.; HANSEN, E.A.; CUNHA, B.A. *Acinetobacter baumannii* pseudomeningitis. **Heart Lung**, v.31, p.76-78, 2002.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, v.2, p.95-108, 2004.

HALSTEAD, D.C.; ABID, J.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial susceptibility among *Acinetobacter calcoaceticus*-*baumannii* complex and *Enterobacteriaceae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **J Infect**, v.55, p.49-57, 2007.

HAMMAMI, S. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. **Tunis Med**, v.89, n.7, p.638-643, 2011.

HANCOCK, R.E.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p.1317-23, 1999

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

HIGGINS, P.G et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.54, p.821–823, 2004.

HIGGINS, P.G. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Ant Chem**, v.65, p.233-238, 2010.

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

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

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, p.305–314, 2010.

HUSNI, R.N. et al. Risk factors for an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter* nosocomial pneumonia among intubated patients. **Chest**, v.115, p.1378-13782, 1999.

IKONOMIDIS, A. et al. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, n. 4, p. 376-7, 2006.

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

JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clinical Microbiol**, v.36, p.1938-1941, 1998.

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

KARAH, N.A.; SUNDSFJORD, K.; TOWNER, Ø. Samuelsen Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii* **Drug Resist Update**, v.15, p.237–247, 2012.

KARAH, N et al. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.4, p.738-744, 2011.

- KIM, J.W. et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>PER-1</sub> and *armA* in a Korean hospital. **Clin Microbiol Infect**, v.14, p.716–718, 2008.
- KIM, S.W. et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. **FEMS Microbiol Lett**, v.301, p.224–231, 2009.
- KING, L.B. et al. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.55, n.3, p.414–421, 2009.
- KO, K.S. et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **J Antimicrob Chemother**, v.60, p.1163–1167, 2007.
- KOH, T.H. et al. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.4, p.627–632, 2007.
- KOHLBERG, A. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. **J Med Microbiol**, v.58, p.1499–1507, 2009.
- KUSRADZE, I. et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. **Int J Antimicrob Agents**, v.38, n.2, p.164–168, 2011.
- LA SCOLA, B.; RAOULT, D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. **Emerg Infect Dis**, v.10, p.1671–1673, 2004.
- LEE J.C. et al. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.109, p.679–684, 2001.
- LEE, H.W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.1, p.49–54, 2008.
- LEE, J.C. et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Res Microbiol**, v.157, p.360–366, 2006.
- LEE, J.C. et al. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. **APMIS**, v.109, p.679–684, 2001.
- LEE, M.H. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> from hospitals in central Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, v.46, n.6, p.419–424, 2013.
- LEE, Y. et al. A novel insertion sequence, IS*Aba*10, inserted into IS*Aba*1 adjacent to the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.361–363, 2011.

LEMBKE, C. et al. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. **Appl Environ Microbiol**, v.72, p.2864-2875, 2006.

LEMOS, E.V. et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v.20, n.5, p.416-423, 2013.

LESHO E. et al. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel *pmrCAB* operon during colistin therapy of wound infections. **J Infect Dis**, v.208, p.1142–1151, 2013.

LESSEL, E.F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. **Int J Syst Bacteriol**, v.21, p.213-214, 1971.

LEVIN, A.S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v.28, p.1008–1011, 1999.

LI, Y. et al. Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23  $\beta$ -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. **J Microbiol Immunol Infect**; v.48, n.1, p.101-108, 2015.

LIAKOPOULOS, A. et al. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. **Euro Surveill**, v.17, n.11, p.201-217, 2012.

LIN, M.F. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in five proximal hospitals in Taiwan. **Jpn J Infect Dis**, v.64, n.3, p.222-227, 2011.

LIN, M.F. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in five proximal hospitals in Taiwan. **Jpn J Infect Dis**, v.64, n.3 p.222-227, 2011.

LIU, Q. et al. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v.9, n.6, e98091, 2014.

LOEHFELM, T.W.; LUKE, N.R.; CAMPAGNARI, A.A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **J Bacteriol**, v.190, p.1036–1044, 2008.

LORENTE, C.; DEL CASTILLO, Y., RELLO, J. Prevention of infection in the intensive care unit: current advances and opportunities for the future. **Curr Opin Crit Care**, v.8, p.461-464, 2002.

LOWINGS, M. et al. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa – an update. **BMC Infect Dis**, v.15, n.1, p.521, 2015.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net/acetobacter.html>. Acesso em: 24 dez 2015.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v.18, p.268–281, 2012.

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

MAMMINA, C. et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.11, p.12-15, 2011.

MANETTI, A.G.; et al. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. **Mol Microbiol**, v.64, p.968-983, 2007.

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

MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1-bla*<sub>OXA-23,51</sub> and IS*Aba1-bla*<sub>ADC-7</sub> genes in Monteria, Colombia. **Braz J Microbiol**, v.43, n.4, p.1274-1280, 2012.

MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, v.23, n.1, p.56-62, 2013.

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

MATASEJE, L.F. et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.6, p.1359-1367, 2012.

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

MEDELL, M. et al. Clinical and microbiological characterization of pneumonia in mechanically ventilated patients. **Braz J Infect Dis**, v.16, n.5, p.442-447, 2012.

MENDES, C.A.; BURDMANN, E.A. Polymyxins - review with emphasis on nephrotoxicity. **Rev Assoc Med Bras**, v.55, n.6, p.752-759, 2009.

MENDES, R.E. et al. Clonal dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy. **Clin Microbiol Infect**, v.15, n.6, p. 588-592, 2009.

MITSUDA, T. [Molecular epidemiology of multidrug-resistant organisms]. **Nihon Rinsho**, v.70, n.2, p.201-204, 2012.

MONIRI, R. et al. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. with emergence of multidrug-resistant strains. **Iranian J Publ Health**, v.39, n.2, p.63–68, 2010.

MONTEFOUR, K., et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. **Crit Care Nurse**, v.28, p.15-25, 2008.

MOSKOWITZ, C. et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.42, p.1915-1922, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOSQUEDA, N. et al. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.10, p.5155-5157, 2013.

MUGNIER, P.D et al. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.1, p.35-40, 2010.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.191, p.2414–2418, 2009.

MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med**, v.358, n.12, p.1271-1282, 2008.

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

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

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

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

NICASIO, A.M.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. **Pharmacotherapy**, v. 28, p.235-249, 2008.

NITZAN, Y.; DEUTSCH, E.B.; PECHATNIKOV, I. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. **Curr Microbiol**, v.45, p.446–455, 2002.

PATON R, et al. ARI-1: b-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v.2, n.2, p.81–87, 1993.

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

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

PILONETTO, M. et al. Hospital gowns as a vehicle for bacterial dissemination in an intensive care unit. **Braz J Infect Dis**, v.8, n.3, p.206-210, 2004.

POGUE, J.M.; COHEN, D.A.; MARCHAIM, D. Editorial commentary: Polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: urgent action needed. **Clin Infect Dis**, v.60, n.9, p.1304-1307, 2015.

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

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structure at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.1442–1448, 2006.

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

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

PRINCIPE, L. et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. **J Clin Microbiol**, v.52, n.8, p.3004-3010, 2014

- RAKA, L. et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in central intensive care unit in Kosova Teaching Hospital. **Braz J Infect Dis**, v.13, n.6, p.408-413, 2009.
- RAO, S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Microbiol**, v.26, p.333–337, 2008.
- RAVASI, P. et al. IS*Aba*825, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and *bla*<sub>OXA-58</sub> expression in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.917–920, 2011.
- RIBERA, A. et al. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.477–480, 2003.
- RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**, v.197, p.1079-1081, 2008.
- RODRÍGUEZ-BAÑO J. et al. Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.3, p.276-278, 2008.
- ROLAIN, J.M. et al. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. **J Infect Dis**, v.204, n.7, p.1146-1147, 2011.
- RUIZ, M. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacilinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. **Clin Microbiol Infect**, v.13 p.1198, 2007.
- RUMBO C. et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. **Infect Immun**, v.82, n.11, p.4666-4680, 2014.
- SADER, H. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis**, v. 5, p.200-214, 2001.
- SATO, K.; NAKAE, T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. **J Antimicrob Chemother**, v.28, p.35-45, 1991.
- SCHIMITH-BIER, K.E. et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. **Am J Infect Control**, v.38, n.4, p.308-314, 2010.
- SEBENY, P.J; RIDDLE, M.S; PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clin Infect Dis**, v.47, p.444-449, 2008.
- SEGAL, H.; THOMAS, R.; ELISHA, B.G. Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. **Plasmid**, v.49, p.169–178, 2003.



SEIFERT, H., et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol**, v.35, p.2819-25, 1997.

SEWARD, R.; LAMBERT, J.T.; TOWNER, K.J. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. **J Med Microbiol**, v.47, p.455-462, 1998.

SIENIAWSKI, K. et al. *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections. **Pol Przegl Chir**, v.85, p.483-90, 2013.

SIEUWERTS, A.M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v.33, n.11, p.813-823, 1995.

SILVA, C.A. et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. **Infect Immun**, v.81, n.7, p.2645-2659, 2013.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.3, p.512-30, 2006.

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

SMANI, Y., McCONNELL, M.J., PACHON, J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. **PLoS ONE**, v.7, e33073, 2012.

SMOLYAKOV, R. et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. **J Hosp Infect**, v.54, n.1, p.32-38, 2003.

SOULI, M. et al. In vitro activity of tigecycline against multiple-drugresistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3166–3169, 2006.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Euro Surveill**, v.13, n.47, p. 19045, 2008.

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

STOEVA, T. et al. Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.618-620, 2009.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v.6, p.187–209, 2002.

SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.194, p.4089–4096, 2012.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233–2239, 1995.

THOMSON, K.S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. **J Clin Microbiol**, v.48, p.1019-1025, 2010.

TOGNIM, M.C. et al. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.27, n.7, p.742-747, 2006.

TOLEDO, P.V. et al. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. **J Hosp Infect**, v.80, n.4, p.351-353, 2012.

TOMARAS, A.P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiol**, v.149, p.3473–3484. 2003.

TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **J Hosp Infect**, v.73, p.355-363, 2009.

TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**, v.44, n.8, p.2974-2976, 2006a.

TURTON, J.F. et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v.258, p.72–77, 2006b.

UNAL, S.; GARCIA-RODRIGUEZ, J. A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.53, p.265–271, 2005.

VALENTINE, S.C. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. **J Clin Microbiol**, v.46, p.2499-2507, 2008.

VALENZUELA, J.K. et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v.45, p.453–460, 2007.

VIANA, G.F. et al, Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. **Lett Appl Microbio**, v.53, n.3, p.374-378, 2011.

VILA, J. et al. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.39, p.757–762 1997.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.6, p.1210-1215, 2007.

WALSH, T.R. et al. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm. **Clin Microbiol Rev**, v.18, p.306-325, 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.57, p.373-383, 2006.

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

WERNECK J.S. et al. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.2, p.452-454, 2011.

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Inter J Antimicrob Agent**, v.12, p.3-7, 1999.

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

YOUNG, L.S.; SABEL, A.L.; PRICE, C.S. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.28, p.1247-1254, 2007.

YOUNG, M.L.; BAINS, M; BELL, A.; HANCOCK, R.E. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, p.2566-68, 1992.

YU, Y.S. et al. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p.454-455, 2007.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET. T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v.32, p.361-385, 2008.

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

ZAVASCKI, A.P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.8, p.71-93, 2010.