

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos e disseminação de amostras clínicas e ambientais de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de biofilme**

Sabrina Royer

Uberlândia - MG  
Julho 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos e disseminação de amostras clínicas e ambientais de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de biofilme**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Sabrina Royer  
Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora)  
Prof. Dr. Paulo P. Gontijo-Filho (co-orientador)

Uberlândia – MG  
Julho 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- 
- R891c  
2017
- Royer, Sabrina, 1981
- Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos e disseminação de amostras clínicas e ambientais de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de biofilme: caracterização molecular de *Acinetobacter baumannii* / Sabrina Royer. - 2017.  
92 p. : il.
- Orientadora: Rosineide Marques Ribas.  
Coorientador: Paulo P. Gontijo Filho.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Acinetobacter baumannii* - Teses. 3. Carbapenêmicos - Teses. 4. Biofilme - Teses. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974. II. Gontijo Filho, Paulo Pinto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Sabrina Royer**

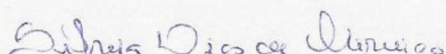
“Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos e disseminação de amostras clínicas e ambientais de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de biofilme”


Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

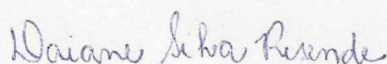
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.


Banca Examinadora:

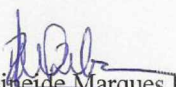
Uberlândia, 18 de julho de 2017.

  
Prof. Dra. Sílvia dias de Oliveira  
PUC/RS

  
Prof. Dra. Cristina C. H. Barata de Oliveira  
UFTM

  
Prof. Dra. Daiane Silva Resende  
UFV

  
Dra. Rebecca T. e Silva Brigido  
UFU

  
Prof. Dra. Rosineide Marques Ribas – orientadora  
ICBIM/UFU

*Dedico este trabalho com muito amor e gratidão aos que  
sempre estiveram comigo, meus pais e irmãos,  
incentivadores incansáveis dos meus estudos.*

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

**[José de Alencar]**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, fonte de toda sabedoria e amor, por ter guiado meus passos, iluminando meus caminhos e permitido que eu chegasse ao fim de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, **Darcy e Ivete**, por todo empenho e dedicação, por me entenderem e estarem comigo em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e apoio, pela torcida, orações e por serem sempre o meu porto seguro. Aos meus irmãos, **André, Betina e Tiago**, pelo carinho, cuidado e companheirismo.

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosineide Marques Ribas**, pela oportunidade de aprendizado, disponibilidade, dedicação e exemplo.

Ao **Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho**, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho, pela oportunidade de aprendizado e pelo exemplo profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) e também da vida, **Ana Paula, Bruna, Daiane, Deivid, Iara, Luiz Gustavo, Melina e Raquel. Paola**, por todo trabalho conjunto neste doutorado, agradeço sua amizade e parceria.

A todos os amigos queridos, que estão presentes em todos os momentos e que comemoram comigo mais esta vitória, em especial **Caroline, Patrícia e Marcela**.

As técnicas do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), **Cristiane e Lícia**, pelo suporte, auxílio e amizade.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, **Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, Dr. Jonny Yokosawa e Dr. Orlando Cesar Mantese**, pelas grandes contribuições no artigo publicado e no projeto de pós-doutorado.

Às professoras, Prof<sup>a</sup>. Dra. **Silvia Dias de Oliveira** (PUCRS), Prof<sup>a</sup>. Dra. **Cristina da Cunha Barata Hueb de Oliveira** (UFTM), Prof<sup>a</sup>. Dra. **Daiane Silva Resende** (UFV), Prof<sup>a</sup>. Dra.

**Rebecca Tavares e Silva Brígido** (UFU), por aceitarem participar da minha banca de Doutorado e pelas contribuições que darão ao trabalho.

As secretárias da coordenação do PPIPA, **Lucélia e Lucileide**, pela atenção e auxílio.

Aos **profissionais de saúde do Hospital de Clínicas**; à equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-UFU; à equipe do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar; aos funcionários do Setor de Registros Médicos por toda ajuda prestada.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, particularmente à **Dra. Daise Aparecida Rossi** e os alunos **Guilherme Paz Monteiro, Roberta Torres de Melo e Eliane Pereira Mendonça**, sempre dispostos a dividir conhecimentos, bem como emprestar reagentes e equipamentos, garantindo o bom desenvolvimento do nosso trabalho.

À doutora **Rebecca Tavares e Silva Brígido** do Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (CREDESH), da Universidade Federal de Uberlândia, por todo apoio e orientação na técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ-UFU), particularmente ao Dr. **Rafael Heilbuth** pelas análises de MEV.

Ao professor **Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman** (USP) e à doutoranda **Louise Teixeira Cerdeira** (USP), pelo suporte técnico e científico na análise do genoma bacteriano.

Aos professores **Dr. Afonso Luis Barth** (UFRGS) e **Dra. Ana Paula Guedes Frazzon** (UFRGS), pela gentileza em ceder amostras controle utilizadas neste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao doutorado.

A todos que torceram e que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, o meu sincero agradecimento.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABELAS .....	15
RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	18
1- INTRODUÇÃO .....	19
2- OBJETIVOS .....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Desenho do estudo e amostras bacterianas .....	27
3.2 Definições .....	29
3.3 Confirmação da resistência à tigeciclina e carbapenêmicos por Etest® .....	30
3.4 Detecção de resistência à tigeciclina pela técnica de Microdiluição em caldo (MD) .....	30
3.5 Técnicas moleculares .....	31
3.5.1 Extração de DNA das amostras de <i>A. baumannii</i> .....	31
3.5.2 Detecção gênica do elemento de inserção <i>ISAbal</i> e das associações <i>ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub></i> e <i>ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub></i> .....	31
3.5.3 Detecção dos genes codificadores das proteínas da membrana externa (PME) de 29 kDa ( <i>carO</i> ) e 33-36kDa ( <i>pme33-36</i> ) por PCR .....	33
3.5.4 Detecção dos genes <i>adeB</i> , <i>adeG</i> e <i>adeJ</i> das bombas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK por PCR multiplex .....	33
3.5.5 qPCR (PCR Quantitativa em Tempo Real) .....	33
3.5.6 Quantificação da expressão gênica .....	33
3.5.7 Extração de RNA .....	34
3.5.8 Síntese do cDNA .....	34
3.5.9 Reação de qPCR .....	35
3.5.10 Análise da expressão gênica .....	35
3.5.11 Caracterização das amostras bacterianas pela técnica de sequenciamento de múltiplos loci - <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	36
3.5.12 Purificação e sequenciamento .....	37
3.6 Avaliação da produção de Biofilme .....	37
3.6.1 Preparação do inóculo bacteriano .....	37
3.6.2 Ensaio de adesão à superfície inerte .....	38
3.6.3 Contagem de células viáveis no biofilme .....	38
3.6.4 Produção de biomassa .....	38
3.6.5 Classificação do biofilme .....	39

3.6.6 Formação de biofilme em esferas de vidro e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	39
3.7 Sequenciamento e montagem do genoma.....	40
3.7.1 Preparo do DNA genômico e sequenciamento .....	40
3.7.2 Montagem dos dados .....	40
3.7.3 Análises <i>in silico</i> .....	40
3.8 Comitê de ética.....	41
3.9 Análise estatística .....	41
4- RESULTADOS .....	41
5- DISCUSSÃO .....	63
6- CONCLUSÕES .....	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO I.....	91
ANEXO II .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Maior ou igual
≥	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitro
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMI	Amicacina
APS	Ampicilina-sulbactam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> ; Coleção de Cultura do Tipo Americana
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> ; Infusão de Cérebro-Coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Alinhamento de Busca Local
CarO	<i>Carbapenem-associated outer membrane protein</i>
CC	Complexo Clonal
CCIH	Controle de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> ; Centros de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CI	Clone Internacional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i> ; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CMH	Caldo Mueller-Hinton
<i>cnp60</i>	60-kDa chaperonin
CPM	Cefepime
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DDD	<i>Defined Daily Dose</i> ; Dose Diária Definida
DMT	<i>Drug/metabolite transporter</i>

<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleoside Triphosphate</i> ; Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido etileno-diamino tetracético
<b>ESBL</b>	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i> ; $\beta$ -lactamases de amplo espectro
<b>et al</b>	E colaboradores
<b>F</b>	Forward
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b><i>gdhB</i></b>	<i>Glucose dehydrogenase B</i>
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b><i>gltA</i></b>	<i>Citrate synthase</i>
<b><i>gpi</i></b>	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>
<b><i>gyrB</i></b>	<i>DNA gyrase subunit B</i>
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>IS</b>	<i>Insertion Sequence</i> ; sequência de inserção
<b>K</b>	Lisina
<b>MATE</b>	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
<b>M<math>\beta</math>L</b>	Metalo- $\beta$ -lactamase
<b>MD</b>	Microdiluição em caldo
<b>MDR</b>	<i>Multidrug-Resistant</i> , Multirresistente
<b>MDRAB</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente
<b>MER</b>	Meropenem
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MFS</b>	<i>Major facilitator superfamily</i>
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i> ; Tipagem por sequenciamento de multilocus
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional de Informação Biotecnológica
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OXA</b>	Oxacilinas

<b><i>p</i></b>	Valor de <i>p</i>
<b>PAV</b>	Pneumonia associada à ventilação mecânica
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBPs</b>	<i>Penicillin-binding proteins</i> ; Proteínas ligadoras de penicilina
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDR</b>	Pandrug Resistance; pan-resistente
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ; Eletroforese em gel de campo pulsado
<b>PME</b>	Proteína de Membrana Externa
<b>Q</b>	Glutamina
<b>qPCR</b>	PCR Quantitativa em Tempo Real
<b>QRDR</b>	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
<b>R</b>	Reverse
<b><i>recA</i></b>	<i>Homologous recombination factor</i>
<b>RND</b>	<i>Resistance-nodulation-division</i>
<b><i>rpoD</i></b>	<i>RNA polymerase sigma fator</i>
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> ; Desvio Padrão
<b>SENTRY</b>	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i> ; Programa de vigilância antimicrobiana
<b>SLV</b>	<i>Single Locus Variant</i> ; Variantes de loco único
<b>SMR</b>	<i>Small multidrug resistance</i>
<b>STs</b>	<i>Sequence Types</i> ; Tipos de Sequências
<b>TBE</b>	<i>Tris, Borate and EDTA</i> ; Tris, Ácido bórico e EDTA
<b>TE</b>	Tris e EDTA
<b>TGC</b>	Tigeciclina
<b>TSA</b>	<i>Trypticase Soy Agar</i> ; Ágar Triptona de Soja
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth</i> ; Caldo Triptona de Soja
<b>UFC/mL</b>	Unidade Formadora de Colônia/mililitro
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial de Saúde
<b>XDR</b>	<i>Extensive Drug Resistance</i> ; extensivamente resistente
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\chi^2</math></b>	Qui-quadrado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organograma representativo dos testes realizados nas amostras clínicas e de ambiente de <i>A. baumannii</i> .....	42
<b>Figura 2.</b> Planta baixa da UTI de Adultos do HC-UFU. Os clones obtidos estão apresentados em cores diferentes e listados a partir da data de isolamento da amostra no respectivo leito do paciente. Também, estão incluídas amostras clínicas e de ambiente/superfície, não tipadas por PFGE, mas resistentes aos carbapenêmicos.....	49
<b>Figura 3.</b> Expressão gênica relativa do gene <i>carO</i> e dos genes relacionados às três bombas de efluxo (AdeABC, AdeFGH e AdeIJK), determinada por qPCR. Os resultados são apresentados em relação à cepa ATCC 19606 utilizada como referência. Cada amostra foi testada em triplicata, em dois ensaios independentes.....	53
<b>Figura 4.</b> Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no software PhyloViz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os <i>Sequence Types</i> (STs).....	56
<b>Figura 5.</b> Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 10 amostras clínicas e ambientais de <i>A. baumannii</i> .....	58
<b>Figura 6.</b> Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme da amostra clínica de <i>Acinetobacter baumannii</i> , Ab13, desenvolvido na superfície de esfera de vidro após 24 horas de incubação.....	60
<b>Figura 7.</b> Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme da amostra ambiental/superfície de <i>Acinetobacter baumannii</i> , Ab15, desenvolvido na superfície de esfera de vidro após 24 horas de incubação.....	61
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da localização da IS <i>AbaI</i> em região adjacente ao gene <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> nas amostras analisadas nesse estudo, formando o Tn2008.....	62
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da localização IS <i>AbaI</i> em região adjacente ao gene <i>bla</i> <sub>ADC-25</sub> nas amostras analisadas nesse estudo.....	62
<b>Figura 10.</b> Alinhamento da sequência do gene <i>carO</i> das duas amostras representativas de <i>Acinetobacter baumannii</i> deste estudo (Ab 13 e Ab15) com as amostras SJ22 (GenBank: KP658474.1) e ATCC 19606 (GenBank: KP658473.1), indicando a homologia e a diferença de aminoácidos. O alinhamento foi construído utilizando <i>ClustalW Alignment</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Reagentes para realização da PCR.....	32
<b>Tabela 1.</b> Linhagens controle utilizadas nos experimentos.....	27
<b>Tabela 2.</b> Características das amostras testes avaliadas nos experimentos.....	28
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes <i>ISAbal</i> , <i>ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub></i> e <i>ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub></i> na reação de PCR.....	32
<b>Tabela 4.</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes das proteínas de membrana externa por PCR.....	33
<b>Tabela 5.</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>adeB</i> , <i>adeG</i> e <i>adeJ</i> na reação de PCR.....	33
<b>Tabela 6.</b> <i>Primers</i> utilizados nas reações de qPCR.....	34
<b>Tabela 7.</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes <i>housekeeping</i> para análise por <i>Multilocus Sequence Typing</i> .....	36
<b>Tabela 8.</b> Critérios para classificação da produção de biofilme.....	39
<b>Tabela 9.</b> Origem e características das amostras de <i>A. baumannii</i> , contendo a classificação de acordo com o resistograma e o fenótipo MDR e XDR.....	44
<b>Tabela 10.</b> Caracterização molecular dos determinantes de resistência e avaliação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para carbapenêmicos e tigeciclina em 23 amostras de <i>A. baumannii</i> , recuperadas de aspirado traqueal e ambiente, da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de adultos, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).....	45
<b>Tabela 11.</b> Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para carbapenêmicos e tigeciclina obtidos através de análise pelo sistema automatizado VITEK 2 <sup>®</sup> , Etest <sup>®</sup> e microdiluição em caldo (MD), para amostras de <i>A. baumannii</i> de origem clínica e ambiental.....	46
<b>Tabela 12.</b> Dados de consumo dos antibióticos Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina, na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), expressos como Dose Diária Definida (DDD) por 1000 pacientes-dia, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.....	47
<b>Tabela 13.</b> Características das 10 amostras de <i>A. baumannii</i> selecionadas para análises por qPCR, produção de Biofilme e MLST.....	51
<b>Tabela 14.</b> Expressão gênica relativa dos genes <i>adeB</i> , <i>adeG</i> , <i>adeJ</i> e <i>carO</i> nas 10 amostras de <i>A. baumannii</i> em comparação à expressão dos genes na cepa de referência ATCC 19606, analisadas através de qPCR. Ensaios realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.....	52

**Tabela 15.** Conjunto de alelos de cada um dos sete *loci* analisados por MLST (esquema de Oxford), STs e CCs correspondentes.....55

**Tabela 16.** Produção de biofilme e multirresistência de amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*.....59

## RESUMO

A emergência de infecções associadas a novos genótipos de *Acinetobacter baumannii* resistente aos antimicrobianos reflete um desafio de grandes proporções. Assim, a detecção e o conhecimento de suas características, tanto epidemiológicas quanto moleculares, é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de tratamento, prevenção e controle. Este trabalho teve como objetivos determinar a diversidade de mecanismos de resistência, avaliar a produção de biofilme através de técnicas fenotípicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e investigar a disseminação clonal e os *Sequence Types* (STs) predominantes em amostras multirresistentes de *A. baumannii* de origem clínica (aspirado traqueal, n=17) e ambiental (superfície, n=6), isoladas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Adicionalmente, uma amostra clínica (clone A) e uma ambiental (clone H) tiveram seu genoma completo sequenciado com análise parcial de seus resistomas. Todas as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes *ISAbal* e sua associação ou não com as oxacilinas (*OXA-51* e *OXA-23*), genes das proteínas de membrana externa (PME) *carO* e *pme33-36* e genes que codificam a expressão das bombas de efluxo AdeABC (*adeB*), AdeFGH (*adeG*) e AdeIJK (*adeJ*). A confirmação da resistência à tigeciclina e aos carbapenêmicos foi feita pelo método do Etest®. A maioria das amostras foi caracterizada como extensivamente resistente (XDR) com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) muito elevadas para tigeciclina e carbapenêmicos. A associação *ISAbal/OXA-51*, *ISAbal/OXA-23* e a presença de *carO* e *pme33-36* foram observadas em 91,3%, 52,2%, 82,6% e 100% das amostras, respectivamente. Quanto aos genes *adeB*, *adeG* e *adeJ*, sua presença foi constatada em todas as amostras analisadas. Avaliou-se também o consumo de Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina (DDD/1000 pacientes-dia), no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. Observaram-se variações no consumo desses antimicrobianos, durante o período investigado. De acordo com os perfis clonais obtidos através da técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) foram selecionadas dez amostras de *A. baumannii* para as análises por PCR em tempo real (qPCR), análise fenotípica da produção de biofilme e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Após avaliação por qPCR, somente o gene *adeB* foi considerado hiperexpresso. Os resultados do MLST demonstraram disseminação policlonal, identificando oito STs e cinco complexos clonais (CCs), com predominância dos CCs 113, 229 e 109. Todas as amostras de *A. baumannii* avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada e produziram biofilme, sem diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais. As imagens de MEV confirmaram a capacidade de adesão e a presença de matriz extracelular visível. Nosso estudo encontrou uma ampla variedade de complexos clonais relacionados com *A. baumannii* XDR carregando o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* frequentemente associado com *ISAbal* (Tn2008) como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, além da hiperexpressão da bomba de efluxo AdeABC. A compreensão dos mecanismos de resistência e do potencial patogênico deste micro-organismo ajuda a explicar sua persistência no ambiente hospitalar e pode fornecer ferramentas para melhorar o tratamento de infecções graves, assim como para aprimorar as medidas de controle e prevenção dessas infecções.

**Palavras-chave:** *A. baumannii*, multirresistência, carbapenêmicos, biofilmes bacterianos, qPCR, MLST.

## ABSTRACT

The emergence of infections associated with new antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes represents a major challenge. Thus, the detection and knowledge of its epidemiological and molecular characteristics have fundamental importance for the development of treatment, prevention, and control strategies. This study aimed to determinate the diversity of resistance mechanisms, to evaluate the biofilm production through phenotypic techniques and scanning electron microscopy (SEM), and to investigate the clonal dissemination and the predominant Sequence Types (STs) in multiresistant strains of *A. baumannii* from clinical (tracheal aspirate, n=17) and environmental (surface, n=6) origin, isolated at the Adult Intensive Care Unit (ICU) of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (HC-UFU). Additionally, one clinical (clone A) and one environmental (clone H) strain had their complete genome sequenced with partial analysis of their resistomes. All strains were submitted to polymerase chain reaction (PCR) for the detection of IS*AbaI* genes and their association or not with oxacillinases (OXA-51 and OXA-23), genes of outer membrane proteins (OMPs) *carO* and *pme33-36*, and genes encoding AdeABC (*adeB*), AdeFGH (*adeG*) and AdeIJK (*adeJ*) efflux pumps. Confirmation of tigecycline and carbapenem resistance was done by the Etest<sup>®</sup>. Most of the strains were characterized as extensively drug-resistant (XDR) with very high minimal inhibitory concentrations (MICs) for tigecycline and carbapenems. The association of IS*AbaI*/OXA-51, IS*AbaI*/OXA-23 and the presences of *carO* and *pme 33-36* were observed in 91.3%, 52.2%, 82.6% and 100% of the strains, respectively. The genes *adeB*, *adeG* and *adeJ* were observed in all strains analyzed. The consumption of Imipenem, Meropenem, Tigecycline and Polymyxin B/Colistin (DDD/1000 patients-day) was also evaluated in the period from January 2011 to December 2012. Changes in the consumption of these antimicrobials were observed during the period investigated. According to clonal profiles obtained by the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique, ten *A. baumannii* strains were selected for analysis by real-time PCR (qPCR), phenotypic analysis of biofilm production and Multilocus Sequence Typing (MLST). Only *adeB* gene was considered hyper-expressed. MLST results demonstrated polyclonal dissemination, identifying eight STs and five clonal complexes (CCs), with predominance of CCs 113, 229 and 109. All *A. baumannii* evaluated strains adhered to the unmodified polystyrene surface and produced biofilm, with no significant difference between clinical and environmental isolates. SEM images confirmed the ability of adhesion and the presence of a visible extracellular matrix. Our study found a wide variety of clonal complexes related to XDR *A. baumannii* carrying the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene frequently associated with IS*AbaI* (Tn2008) as the main mechanism of carbapenems resistance, in addition to the over expression of the AdeABC efflux pump. The understanding of the mechanisms of resistance and the pathogenic potential of this microorganism helps to explain its persistence in the hospital environment and can provide tools to improve the treatment of serious infections, as well as, the measures of control and prevention of these infections.

**Keywords:** *A. baumannii*, multiresistance, carbapenems, bacterial biofilms, qPCR, MLST.

## 1- INTRODUÇÃO

A detecção de patógenos epidemiologicamente importantes como *Acinetobacter baumannii*, circulantes em ambiente ou população, e o conhecimento de suas características tanto epidemiológicas quanto moleculares, são de fundamental importância no desenvolvimento de estratégias de tratamento, prevenção e controle de infecções, além de contribuir para a previsão de surtos (GORDON; WAREHAM, 2010).

*A. baumannii* é um problema crescente para a população hospitalizada principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), particularmente em indivíduos imunocomprometidos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; CAMP; TATUM, 2010; SANDIUMENGE; RELLO, 2012; DOI; MURRAY; PELEG, 2015), uma vez que infecções causadas por esse micro-organismo estão associadas com maior morbidade, mortalidade, tempo de internação e custos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; PEREZ et al., 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GORDON; WAREHAM, 2010; LIU et al., 2014; MARAKI et al., 2016). A sua importância clínica está associada com a erradicação difícil, considerando que as opções para tratamento de infecções graves como pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) são limitadas devido ao aumento da incidência de amostras multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) no ambiente hospitalar (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008; MARAGAKIS; PERL, 2008; MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008; VALENCIA et al., 2009; KAYE; POGUE, 2015; HE et al., 2016; TSIOUTIS et al., 2016; GUPTA et al., 2017).

A dificuldade no tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos extensivamente resistentes levou ao retorno da utilização de polimixinas (polimixina B e colistina) em nível mundial, como opção no tratamento dessas infecções (STEIN; RAOULT, 2002; FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006; BISWAS et al., 2012; LIU et al., 2014; ATS, 2005; GARNACHO-MONTERO et al., 2014; GIRARDELLO et al., 2017). As amostras de *A. baumannii* XDR permanecem em grande parte suscetíveis à colistina na maioria dos países (GARNACHO-MONTERO et al., 2003), mas o seu uso excessivo ou inadequado está associado à emergência de cepas resistentes (KARAIKOS; GIAMARELLOU, 2014). Por outro lado, taxas elevadas de resistência são relatadas cada vez mais para outros antibióticos, como, por exemplo, a tigeciclina (SUN et al., 2013; KARAIKOS; GIAMARELLOU, 2014).

A rápida emergência e disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos nos hospitais é um problema de grande proporção e a causa é multifatorial, incluindo: pressão seletiva devido ao seu uso inapropriado e empírico e a disseminação de amostras com estes fenótipos é facilitada pela transmissão cruzada pessoa-a-pessoa, em função da baixa adesão às práticas básicas de prevenção e controle de infecções pelos profissionais de saúde (DYAR; PAGANI; PULCINI, 2015). No Brasil, essa questão é também significativa devido à alta densidade de uso de antibióticos, particularmente da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e também de fluorquinolonas (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014; DANTAS et al., 2017).

Na tentativa de monitorar as amostras resistentes, estudos avaliam a relação entre o uso excessivo de antibióticos e a seleção de amostras resistentes através da Dose Diária Definida (DDD) (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011). O DDD é considerado um bom marcador para avaliação do consumo de antimicrobianos, permitindo comparar taxas de micro-organismos e seus fenótipos de resistência. Adicionalmente, inúmeros estudos confirmam a relevância do número de DDD por 1000 pacientes-dia como uma unidade de medida para comparar uso de antimicrobianos entre diferentes países e regiões (MONNET; MÖLSTAD; CARS, 2004).

É consenso que a resistência bacteriana é um fator importante no aumento dos índices de mortalidade em pacientes criticamente doentes (AZEVEDO, 2005), e que as infecções por amostras resistentes vem aumentando expressivamente, tornando-se um problema de saúde pública, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*), associações de Controle de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde, além da indústria farmacêutica internacional (HAMBRAEUS, 2006). Neste contexto, destaca-se a importância clínica de *A. baumannii*, considerando seus níveis crescentes de resistência, sua capacidade de resistir à desinfecção, persistir por longo período de tempo em superfícies e produzir biofilme, o que contribui para sua sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente hospitalar (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007; KEMPF; ROLAIN, 2012).

O fenótipo de resistência às múltiplas drogas em *A. baumannii* é mediado por todos os principais mecanismos de resistência, incluindo modificação de sítio alvo, inativação enzimática, efluxo ativo e diminuição no influxo de drogas (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). A resistência pode ser intrínseca, devido à produção de cefalosporinases, codificada cromossomicamente, além da baixa permeabilidade de membrana, ou adquirida, após a

transferência de genes ou mutação nos genes estruturais ou regulatórios (YOON; COURVALIN; GRILLOT-COURVALIN, 2013). Além disso, apresenta capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies inanimadas, tais como equipamentos hospitalares (LIU et al., 2014).

Atualmente, no Brasil, o principal problema no tratamento de infecções graves causadas por *A. baumannii* MDR é a produção de  $\beta$ -lactamases, que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos como imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, e as cefalosporinas de amplo espectro como ceftazidima e cefepime (MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008; GALES et al., 2012). Como os carbapenêmicos são usualmente as drogas de escolha no tratamento dessas infecções, vários trabalhos relataram o aumento da taxa de resistência a esses antimicrobianos em várias regiões do mundo (POIREL; NORDMANN, 2006; MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; KEMPF; ROLAIN, 2012). Na América Latina, dados do SENTRY demonstram que essa resistência vem aumentando de forma significativa, com taxas variando de 12,6 a 71,4% (GALES et al., 2012). Além do aumento na incidência dessas amostras, vários estudos relatam que *A. baumannii* é o responsável por grande parte dos casos de PAV nos países em desenvolvimento, América do Norte e Europa (CHASTRE; FAGON, 2002; ARABI et al., 2008; GRGURICH et al., 2012; KOULENTI; TSIGOU; RELLO, 2016).

O mecanismo de resistência mais relevante presente em *A. baumannii* é a produção de  $\beta$ -lactamases adquiridas, incluindo serina e metalo- $\beta$ -lactamases, as quais conferem resistência aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Essas enzimas são um grupo heterogêneo de  $\beta$ -lactamases, do qual fazem parte a classe A (penicilinas), B (metaloenzimas) e D (oxacilinas) de Ambler, que hidrolisam imipenem e meropenem, além de outras penicilinas e cefalosporinas (QUEENAN; BUSH, 2007). As carbapenemases do tipo oxacilinas (OXA) são mundialmente reconhecidas como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp., especialmente no ambiente hospitalar (CARVALHO et al., 2009; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011; LABARCA et al., 2014).

Nessa espécie, as oxacilinas são classificadas em seis subgrupos principais: OXA-23-“like” (OXA-23, OXA-27 e OXA-49), OXA-24-“like” (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72), OXA-58, OXA-51-“like”, esse último constituindo uma família de enzimas cromossômicas típicas de *A. baumannii* (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006) usadas como marcador taxonômico da espécie (HÉRITIER et al., 2005), OXA-143, detectada em amostras de sangue recuperadas de pacientes internados em UTI brasileira e, atualmente, disseminada, porém restrita ao Brasil (HIGGINS et al., 2009; HIGGINS et al., 2013), e OXA-235, recentemente descrita

em isolados nos Estados Unidos e México (OXA-235-“like”, OXA-235, OXA-236 e OXA-237) (HIGGINS et al., 2013). No Brasil, a OXA-23 é a principal oxacilinase responsável pela resistência aos carbapenêmicos nos hospitais (DALLA-COSTA et al., 2003; CARVALHO et al., 2009; MARTINS et al., 2009; MOSTACHIO et al., 2009; ROYER et al., 2015), e em 2010 este fenótipo foi detectado em amostras de origem ambiental (GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2010).

Índices elevados de resistência aos carbapenêmicos devido a expressão de genes que codificam as carbapenemases da classe D requerem um promotor forte como a sequência de inserção móvel *ISAbal* (ZONG et al., 2008). Essas sequências de inserção funcionam como promotores dos genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e *bla*<sub>OXA-23-like</sub> quando se localizam antes dessa sequência, resultando em hiperexpressão gênica, consequentemente, elevando os níveis de resistência aos carbapenêmicos (RUIZ et al., 2007). *ISAbal*, *ISAbal2*, *ISAbal3* e *ISAbal4* também foram identificados adjacentes aos genes *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub> em amostras de *A. baumannii* e estão associados com redução da suscetibilidade a esse antibiótico (POIREL; NORDMANN, 2006; LEE et al., 2011). As ISs mais frequentemente associadas aos genes de carbapenemases em MDRAB são *ISAbal*, *ISAbal2*, *ISAbal3*, *ISAbal4* e *IS18* (VILLALÓN et al., 2013; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016).

Além da presença de OXA carbapenemases, a alteração na permeabilidade das proteínas de membrana externa (PME) ou porinas e a hiperexpressão de bombas de efluxo também são mecanismos de resistência importantes em *A. baumannii*. A diminuição ou perda de três PME, proteína de 33-36 kDa, de 29 kDa chamada de CarO (*carbapenem-associated outer membrane protein*) e de 43 kDa, foi descrita em amostras de *A. baumannii* resistentes ao imipenem (LIMANSKY; MUSSI; VIALE, 2002; FERNÁNDEZ-CUENCA et al., 2003; SIROY et al., 2005; VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007; GORDON; WAREHAM, 2010). Há evidências que a porina CarO pode ser responsável pela resistência ao imipenem quando da ruptura do gene, resultando na falta de formação de poros na membrana externa, se houver mudanças na composição de aminoácidos nas isoformas CarOa e CarOb, que podem alterar a porina, contribuindo para redução na afinidade pelo antimicrobiano, e na redução da expressão do gene *carO* (FONSECA et al., 2013; NOVOVIC et al., 2015).

A hiperexpressão de bombas de efluxo é outro mecanismo relevante em *A. baumannii*. Atualmente, são descritas seis famílias de sistema de efluxo: *ATP binding cassette* (ABC); *major facilitator superfamily* (MFS); *resistance-nodulation-division* (RND); *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE); *small multidrug resistance* (SMR) e *drug/metabolite transporter* (DMT) (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007). A hiperexpressão de três bombas

pertencentes à família RND, a saber: AdeABC (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001), AdeFGH (COYNE et al., 2010), e AdeIJK (DAMIER-PIOLLE et al., 2008), estão associadas com a multirresistência neste micro-organismo (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011). O sistema de efluxo AdeABC foi o primeiro a ser descrito, sendo o mais conhecido (RUZIN; KEENEY; BRADFORD, 2007), e é responsável por conferir resistência à aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, cloranfenicol e trimetoprim (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001) além de tigeciclina (PELEG; ADAMS; PATERSON, 2007; RUZIN; KEENEY; BRADFORD, 2007; RUZIN; IMMERMANN; BRADFORD, 2010). O sistema AdeFGH tem como substratos cloranfenicol, clindamicina, fluoroquinolonas, trimetoprim, tetraciclina, tigeciclina e sulfonamida (COYNE et al., 2010), e a bomba AdeIJK contribui para resistência à  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, fluoroquinolonas, ácido fusídico, novobiocina, e trimetoprim (DAMIER-PIOLLE et al., 2008).

Apesar do grande número de trabalhos relatarem a associação entre surtos hospitalares de *A. baumannii* e resistência a antibióticos, os fatores determinantes da virulência e patogenicidade deste micro-organismo requerem mais investigação (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014). Há evidências que a capacidade de formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência comuns a um grande número de amostras clínicas, incluindo de *A. baumannii* (RODRIGUEZ-BAÑO et al., 2008; KING et al., 2009; EIJKELKAMP et al., 2011; ESPINAL; MARTÍ; VILA, 2012; GURUNG et al., 2013).

É conhecido que amostras clínicas de *A. baumannii* apresentam capacidade de sobreviver por longo período de tempo em superfícies abióticas e secas, como demonstrado por Jawad e colaboradores (1998), que evidenciaram que essa capacidade, relacionada à formação de biofilme, é uma característica comum entre as amostras de *Acinetobacter*, principalmente naquelas recuperadas de cateteres ou de corrente sanguínea.

Biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células se aderem umas às outras e a uma superfície viva ou inerte. Estas células estão envolvidas por uma matriz de polímero extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (LAPPIN-SCOTT, BASS, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016). O biofilme de *Acinetobacter* desempenha um papel importante em doenças como fibrose cística, peritonite, e infecções de corrente sanguínea e trato urinário associado a cateteres, devido a sua habilidade de colonização e multiplicação no lúmen destes dispositivos invasivos (GADDY; ACTIS, 2009). O tratamento de infecções por estas amostras é especialmente complicado, uma vez que utilizando

uma variedade de mecanismos, bactérias em biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos quando comparadas às mesmas células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011). Além disso, a frequência crescente de resistência aos antibióticos entre as bactérias formadoras do biofilme torna o tratamento ainda mais difícil (KWON et al., 2008). O conhecimento detalhado sobre a formação de biofilme e bactérias capazes de produzi-lo é necessário para o tratamento de infecções relacionadas. Além disso, a determinação da diversidade genética pode ser útil na prevenção da disseminação de micro-organismos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde e para implementação de procedimentos preventivos e medidas de controle.

Os métodos de tipagem molecular são fundamentais para determinar se os micro-organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados, auxiliando na detecção de surtos, pela presença de genes de resistência e de amostras clonais, possibilitando a identificação da transmissão cruzada e de fontes de infecção, e consequentemente no monitoramento e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (SINGH et al., 2006).

A técnica de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) é considerada o padrão ouro para muitas espécies, por sua reprodutibilidade e poder discriminatório (HAMOUDA et al., 2010). É uma técnica adequada no estudo de isolados de ambiente epidemiológico quanto a relações temporal e espacial (ADAMS-HADUCH et al., 2011). Atualmente, técnicas de sequenciamento como *Multilocus Sequence Typing* (MLST) também são utilizadas na tipagem de amostras hospitalares, em função da sua facilidade, rapidez e capacidade de análise evolutiva das espécies, permitindo a comparação dos resultados de diferentes períodos, instituições e países, ao longo do tempo (MAIDEN, 2006; ADAMS-HADUCH et al., 2011).

Vários métodos de tipagem molecular são utilizados para a caracterização epidemiológica de *A. baumannii*, proporcionando diferentes níveis de discriminação (TOMASCHEK et al., 2016). Apesar da técnica de PFGE ainda ser considerada como o método de escolha quando se trata de análise de surtos (SEIFERT et al., 2005; ADAMS-HADUCH et al., 2011), o MLST é outro método frequentemente utilizado, que simplificou significativamente a análise de parentesco entre as amostras e foi projetado para estudar estruturas populacionais de patógenos bacterianos (URWIN; MAIDEN, 2003). Dois esquemas de MLST foram desenvolvidos para *A. baumannii*, sendo o primeiro difundido por Bartual e colaboradores (esquema de Oxford) (BARTUAL et al., 2005) enquanto o segundo foi desenvolvido no Instituto Pasteur (esquema Pasteur) (DIANCOURT et al.,

2010). Ambos trabalham com sete genes *housekeeping* e têm três genes em comum (TOMASCHEK et al., 2016).

Há três linhagens clonais distintas de *A. baumannii* descritas, que por sua distribuição geográfica foram nomeadas de clones europeus I, II e III (DIJKSHOORN et al., 1996; VAN DESSEL et al., 2004). Quando se tornou evidente a sua distribuição global, passaram a ser chamadas de clones internacionais (CI) 1, 2 e 3 (DIANCOURT et al., 2010). A maioria dos surtos notificados até o momento envolvem o CC92, correspondente ao CI2, e o CC109, correspondente ao CI1 (KARAH et al., 2012; TOMASCHEK et al., 2016).

A disseminação mundial do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> está associada a clones específicos, principalmente o CC92, que é o maior e mais disseminado complexo clonal do banco de dados do MLST de *A. baumannii*, e o CC109 (KARAH et al., 2012; CLÍMACO et al., 2013; HUANG et al., 2016). Estas amostras pertencentes ao CC92 foram identificadas em muitos países do mundo, incluindo Austrália, Estados Unidos, China, Itália, França, Taiti, Vietnã, Coreia do Sul, Tailândia e África do Sul (KARAH et al., 2012; CLÍMACO et al., 2013; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013).

Nos países latino-americanos, os perfis alélicos do MLST de *A. baumannii* não foram relacionados com o CC92, predominante em todo o mundo, mas tem sido comumente relatadas como pertencentes ao CC113 (GROSSO et al., 2011; MARTINS et al., 2013; STIETZ et al., 2013). No Brasil, as amostras resistentes aos carbapenêmicos também foram identificadas como pertencentes a outro complexo clonal internacional, denominado CC109 (MARTINS et al., 2012; CLÍMACO et al., 2013).

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração, estão evoluindo rapidamente. O sequenciamento completo do genoma tornou-se uma ferramenta importante na tipagem bacteriana e mais recentemente, comparações de genoma completo produziram informações sobre a evolução da patogenicidade em *A. baumannii* e no gênero *Acinetobacter*, revelando ampla diversidade no conteúdo de genes, incluindo variação nos determinantes de resistência e virulência (WRIGHT et al., 2014; HOLT et al., 2016). Também, essa técnica molecular oferece informações quanto a surtos, redes de transmissão, e melhor compreensão da evolução filogenética de agentes infecciosos (SNITKIN et al., 2012; FITZPATRICK; OZER; HAUSER, 2015; MATHERS et al., 2015).

A avaliação dos determinantes de resistência de amostras de *A. baumannii* é de grande relevância epidemiológica, sobretudo no ambiente hospitalar, em função de sua importância crescente, particularmente de amostras com altos índices de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos

(antibióticos amplamente prescritos na prática clínica) e detectados previamente por nossa equipe (MOREIRA et al., 2013; DANTAS et al., 2014; ROYER et al., 2015; DANTAS et al., 2017). Atualmente, as amostras de *A. baumannii* recuperadas de nossa instituição se apresentam com índices de resistência aos carbapenêmicos e tigeciclina alarmantes, porém a análise da sua disseminação, bem como produção de biofilme e sequenciamento do genoma completo ainda não foram estudados. O presente estudo propõe responder algumas questões ainda não completamente esclarecidas sobre a epidemiologia desse agente.

## 2- OBJETIVOS

Considerando a necessidade de realizar estudos que permitam compreender melhor os mecanismos de resistência e a capacidade de formação de biofilme em *Acinetobacter baumannii*, foram propostos os seguintes objetivos:

- Confirmar a resistência das amostras à tigeciclina e carbapenêmicos por Etest<sup>®</sup>;
- Determinar a presença dos genes *ISAbal*, *ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub>* e *ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub>*, das proteínas de membrana externa (PME) *carO* e *pme33-36* e os genes *adeB*, *adeG* e *adeJ* das bombas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK, e sua relação com aumento na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e resistência aos carbapenêmicos;
- Analisar o consumo de Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina, através da dose diária definida (DDD) por 1000 pacientes-dia;
- Avaliar a expressão gênica dos sistemas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK e da porina CarO por qPCR;
- Determinar, por MLST, o *sequence type* (ST) e os complexos clonais dos pulsotipos obtidos através do PFGE;
- Analisar a formação de biofilme em amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii* através de técnicas fenotípicas bem como por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a sequência completa do genoma de uma amostra clínica (clone A) e uma ambiental (clone H) de *A. baumannii*, com análise de seus resistomas e depositar o genoma no GenBank (NCBI).

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do estudo e amostras bacterianas

Durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado, de abril de 2011 a junho de 2012, foi realizado um estudo de coorte prospectivo na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) onde foram coletadas amostras de *Acinetobacter baumannii* resistentes e suscetíveis aos carbapenêmicos, de aspirado traqueal e de ambiente (n=55). A partir dessa vigilância foram selecionadas 23 amostras de *A. baumannii* para avaliação nessa pesquisa, sendo 17 de aspirado traqueal e seis de ambiente, as quais apresentaram reduzida sensibilidade aos carbapenêmicos. As amostras controle e testes caracterizadas previamente e que foram utilizadas nos experimentos estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Linhagens controle utilizadas nos experimentos

<b>Linhagem controle</b>	<b>Experimento</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Etest®
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Etest®
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Microdiluição em caldo
<i>Acinetobacter baumannii</i> POA 4-28 (IS <i>Aba1</i> / <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> )	PCR
<i>Acinetobacter baumannii</i> 3-409 GHC (IS <i>Aba1</i> / <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> )	PCR
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	PCR; qPCR; Biofilme

**Tabela 2.** Características das amostras testes avaliadas nos experimentos

Amostras	Origem	Data de isolamento	Perfil de resistência	Genótipo de Oxacilinase <sup>a</sup>	Perfil PFGE <sup>b</sup>
1	Aspirado traqueal	09/05/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
2	Aspirado traqueal	11/08/2011	CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
3	Aspirado traqueal	19/08/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
4	Aspirado traqueal	29/08/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
5	Aspirado traqueal	14/10/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	D
6	Aspirado traqueal	31/12/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
7	Aspirado traqueal	17/01/2012	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
8	Aspirado traqueal	11/02/2012	APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
9	Aspirado traqueal	17/03/2012	APS; CPM; CIP; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	C
10	Aspirado traqueal	03/05/2012	APS; CPM; CIP; IPM	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	B
11	Aspirado traqueal	19/06/2012	APS; CPM; CIP; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
12	Aspirado traqueal	25/06/2012	AMI; APS; CPM; CIP; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	C
13	Aspirado traqueal	02/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
14	Aspirado traqueal	27/06/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	G
15	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
16	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
17	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
18	Superfície	07/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	G
19	Superfície	15/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
20	Superfície	11/05/2012	APS; CPM; IPM	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	E
21	Aspirado traqueal	22/02/2012	CPM; CIP; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	G
22	Aspirado traqueal	10/01/2012	CPM; CIP; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	F
23	Aspirado traqueal	26/12/2011	APS; CPM; CIP; TGC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	G

<sup>a</sup>Todas amostras negativas para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>; <sup>b</sup>PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; AMI, amicacina; APS, ampicilina-sulbactam; CPM, cefepime; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IPM, Imipenem; MER, meropenem; TGC, Tigeciclina.

### 3.2 Definições

***Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDR):** resistência a pelo menos um agente antimicrobiano dentro de 3 ou mais categorias: Aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina e netilmicina), Carbapenêmicos antipseudomonas (imipenem, meropenem e doripenem), Fluorquinolonas antipseudomonas (ciprofloxacino e levofloxacino), Penicilinas antipseudomonas/Inibidores de  $\beta$ -lactamases (piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico), Cefalosporinas de espectro ampliado (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidima e cefepime), Inibidores da via do Folato (sulfametoxazol-trimetoprima), Penicilinas/Inibidores de  $\beta$ -lactamases (ampicilina-sulbactam), Polimixinas (colistina e polimixina B), Tetraciclina (tetraciclina, doxiciclina, minociclina) (MAGIORAKOS et al., 2012) (ANEXO I).

***Acinetobacter baumannii* extensivamente resistente (XDR):** resistência a pelo menos um agente antimicrobiano incluindo todas as categorias mencionadas, podendo ser excluída até duas categorias (MAGIORAKOS et al., 2012) (ANEXO I).

#### **Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000/pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia)**

Foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000 pacientes/dia os seguintes antibióticos: Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina, conforme recomendando pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

$$DDD = \frac{\text{Consumo de antibióticos em gramas}}{\text{Dose diária definida (NNIS, 2004)}}$$

$$DDD/1000 \text{ pacientes-dia} = \frac{DDD}{N^{\circ} \text{ de pacientes-dia}^*} \times 1000$$

\* Pacientes-dia:  $P \times L \times T$

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

T = índice de ocupação no tempo considerado (%).

Para o cálculo do DDD, o relatório de consumo dos antimicrobianos na UTI de Adultos foi obtido na farmácia do HC-UFU.

### 3.3 Confirmação da resistência à tigeciclina e carbapenêmicos por Etest<sup>®</sup>

As 23 amostras de *A. baumannii* foram testadas pelo método de Etest<sup>®</sup> (bioMérieux, Durham, NC, USA), para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e tigeciclina. Uma suspensão de cada amostra de *A. baumannii* em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), ajustada à escala 0,5 de McFarland, foi semeada em placa de agar Mueller-Hinton com auxílio de *swab* de modo a obter crescimento confluyente. Quando a superfície do ágar estava completamente seca foram aplicadas as fitas de Etest<sup>®</sup> e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Os resultados foram analisados conforme as recomendações do CLSI (2015). Pela inexistência de dados sobre tigeciclina para *Acinetobacter* spp., foram usados os pontos de corte propostos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) listados para Enterobacteriaceae, a saber:  $\leq 2$ , 4 e  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  para amostras suscetíveis, intermediárias e resistentes, respectivamente. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.4 Detecção de resistência à tigeciclina pela técnica de Microdiluição em caldo (MD)

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para todas as 23 amostras, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2015) e os pontos de corte propostos pelo FDA. O antimicrobiano tigeciclina (Tygacil<sup>®</sup>) foi dissolvido no diluente apropriado e, a partir da solução estoque, foram feitas diluições para obtenção da solução inicial adequada. O ensaio foi preparado em duplicata em diferentes períodos de tempo. 100  $\mu\text{L}$  do antimicrobiano preparado a uma concentração acima da concentração inicial desejada na microplaca de 96 poços, foi colocado na primeira coluna. Adicionalmente, 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton (CMH) foi pipetado em todos os demais poços, exceto os da primeira coluna. A seguir, foi realizada uma diluição seriada do antimicrobiano (256  $\mu\text{g/mL}$  – 0,125  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo pipetado 100  $\mu\text{L}$  do volume da primeira coluna e passada para os poços das colunas seguintes com homogeneização em todos os poços. Depois dessa etapa, foi adicionado 80  $\mu\text{L}$  de CMH em todos os poços e, por fim, 20  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas preparadas segundo a escala 0,5 de McFarland. Após inoculação, as placas foram fechadas e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 a 20 horas. Como controle de esterilidade foi utilizada uma coluna sem adição da suspensão bacteriana, e como controle negativo do ensaio foi utilizada a cepa ATCC

29212. A leitura das microplacas foi realizada em local com boa iluminação, através de observação macroscópica do crescimento bacteriano.

### 3.5 Técnicas moleculares

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) para os genes das sequências de inserção *ISAbal*, *ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub>* e *ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub>*, para os genes codificadores das proteínas de membrana externa (PME) de 29 kDa (*carO*) e 33-36kDa (*pme33-36*), e para os genes *adeB*, *adeG* e *adeJ* das bombas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK, respectivamente, foram feitas para as 23 amostras incluídas no estudo, enquanto as técnicas de qPCR e MLST foram realizadas para 10 das 23 amostras de acordo com os perfis clonais detectados pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

#### 3.5.1 Extração de DNA das amostras de *A. baumannii*

A extração por lise térmica foi realizada segundo o protocolo de Jin e colaboradores (2009), com pequenas modificações. Amostras de *A. baumannii* foram cultivadas *overnight*, a 37°C, em agar “*Trypticase Soy Agar*” (TSA) e 5 a 6 colônias foram transferidas para tubos *ependorf* com 500µL de água ultrapura e então vortexadas. A suspensão resultante foi então fervida a 100°C por 10 min em banho-maria, o sobrenadante com DNA extraído transferido para outro tubo, quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®) e conservado a -20°C até a utilização.

#### 3.5.2 Detecção gênica do elemento de inserção *ISAbal* e das associações *ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub>* e *ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub>*

Em todas as amostras incluídas no estudo para avaliar a presença do gene que codifica o elemento de inserção *ISAbal* e das associações *ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub>* e *ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub>* foram realizadas técnicas de PCR com *primers* consensos para cada gene, utilizando reagentes para um volume final de reação de 25µL, conforme descrito no quadro 1. Os *primers* utilizados nas reações estão listados na tabela 3.

**Quadro 1.** Reagentes para realização da PCR

Reagentes	Volume	Concentração final
Produto da extração de DNA (10 ng/μL)	2 μL	0,4 ng/UL
<i>primer</i> forward (10 μM)	0,75 μL	0,3 μM
<i>primer</i> reverse (10 μM)	0,75 μL	0,3 μM
GoTaq® Green Master Mix, 2x	12,5 μL	1x
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 25 μL	n.a.

**Tabela 3.** *Primers* utilizados para a amplificação dos genes *ISAbal*, *ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub>* e *ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub>* na reação de PCR

Gene alvo	Primer	Sequência (5' – 3')	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>ISAbal</i> <sup>1</sup>	F	CACGAATGCAGAAGTTG	51	549
	R	CGACGAATACTATGACAC		
<i>ISAbal/bla<sub>OXA-23-like</sub></i> <sup>2</sup>	F	CACGAATGCAGAAGTTG	53	1456
	R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
<i>ISAbal/bla<sub>OXA-51</sub></i> <sup>2</sup>	F	CACGAATGCAGAAGTTG	45	1107
	R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		

<sup>1</sup>Segal et al., 2005; <sup>2</sup>Turton et al., 2006; F = *Forward*; R = *Reverse*.

A amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler®, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento à temperatura específica de cada *primer* por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A eletroforese correu a 100V, por cerca de 60 minutos, em agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5μL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100mL de tampão e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

### 3.5.3 Detecção dos genes codificadores das proteínas da membrana externa (PME) de 29 kDa (*carO*) e 33-36kDa (*pme33-36*) por PCR

Os *primers* utilizados nas reações estão descritos na tabela 4. A amplificação, análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito anteriormente.

**Tabela 4.** *Primers* utilizados para amplificação dos genes das proteínas de membrana externa por PCR

Gene alvo	Primer	Sequência (5' – 3')	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>pme33-36</i> <sup>1</sup>	F	CATCGATGGCACTAACATGG	60	175
	R	AGTGTGACCACCCCAAACAT		
<i>carO</i> <sup>2</sup>	F	CATATGAAAGTATTACGTGTTTTAGTG	55	750
	R	GGTACCTTACCAGTAGAAGTTTACACC		

<sup>1</sup>Mostachio et al., 2012; <sup>2</sup>Lu et al., 2009; F = *Forward*; R = *Reverse*.

### 3.5.4 Detecção dos genes *adeB*, *adeG* e *adeJ* das bombas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK por PCR multiplex

Os *primers* utilizados na reação estão descritos na tabela 5. A amplificação, análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito anteriormente.

**Tabela 5.** *Primers* utilizados para amplificação dos genes *adeB*, *adeG* e *adeJ* na reação de PCR

Gene alvo	Primer	Sequência (5' – 3')	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>adeB</i> <sup>1</sup>	F	TTAACGATAGCGTTGTA	52	541
	R	ACCTGAGCAGACAATGGAATAGT		
<i>adeG</i> <sup>2</sup>	F	CTTGCAATTTACGTGTGGTGT		201
	R	GCTTTTCTACTGCACCCAAA		
<i>adeJ</i> <sup>1</sup>	F	ATTGCACCACCAACCGTAAC		463
	R	TAGCTGGATCAAGCCAGATA		

<sup>1</sup>Lin et al., 2009; <sup>2</sup>Yoon; Courvalin; Grillot-Courvalin, 2013; F = *Forward*; R = *Reverse*.

### 3.5.5 qPCR (PCR Quantitativa em Tempo Real)

### 3.5.6 Quantificação da expressão gênica

Através da técnica de qPCR, utilizando-se os pares de *primers* descritos na tabela 6, foi realizada a quantificação da expressão dos genes *adeB* (AdeABC), *adeG* (AdeFGH) e *adeJ*

(AdeIJK), que codificam componentes dos sistemas de efluxo da superfamília RND (*Resistance Nodulation Division*), e do gene codificador da PME de 29 kDa (*carO*), e comparados com a expressão da cepa *A. baumannii* ATCC 19606. O gene *rpoB* foi utilizado como controle endógeno da reação para normalização dos dados de expressão transcricional dos genes alvo. Previamente à reação foi realizado o teste de eficiência dos *primers*. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (CREDESH – UFU).

**Tabela 6.** *Primers* utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sistema de efluxo ou Proteína alvo	Primers	Sequência (5' – 3')
<i>adeB</i> <sup>1</sup>	AdeABC	<i>adeB</i> F	CTTGCATTTACGTGTGGTGT
		<i>adeB</i> R	GCTTTTCTACTGCACCCAAA
<i>adeG</i> <sup>1</sup>	AdeFGH	<i>adeG</i> F	TTCATCTAGCCAAGCAGAAG
		<i>adeG</i> R	CCTGCTAATGGTAGGGTTAAG
<i>adeJ</i> <sup>1</sup>	AdeIJK	<i>adeJ</i> F	GGTCATTAATATCTTTGGC
		<i>adeJ</i> R	GGTACGAATACCGCTGTCA
<i>carO</i> <sup>2</sup>	PME 29kDa	<i>carO</i> F	GCAATGGCAGATGAAGC
		<i>carO</i> R	TAAAGCACCACCGTAACC
<i>rpoB</i> <sup>1</sup>	--	<i>rpoB</i> F	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC
		<i>rpoB</i> R	ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC

<sup>1</sup>Yoon; Courvalin; Grillot-Courvalin, 2013; <sup>2</sup>Cardoso et al., 2016.

### 3.5.7 Extração de RNA

O RNA total dos isolados foi obtido a partir de uma suspensão bacteriana na concentração de  $1 \times 10^9$  células e extraído utilizando o PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit (Life Technologies<sup>TM</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. A seguir, foram quantificadas em relação a sua concentração, expressa em ng/μL, através da medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop<sup>®</sup>), e, concomitantemente, foram analisadas quanto à pureza determinada pela razão A260/280, e aquelas que se situassem dentro do limiar entre 1,9 e 2,1 foram consideradas puras e armazenadas a -80 °C para posterior processamento e análise.

### 3.5.8 Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de um volume de 10μL do RNA total extraído, partindo de uma concentração de RNA de 12,5ng/μL e volume final de 30μL, utilizando o

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. O volume final da reação de transcrição reversa foi de 20µL, sendo 2µL de tampão de reação da enzima, 0,8µL de dNTP, 2µL de *primers* randômicos, 1µL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 4,2µL de água livre de nuclease, 10µL de RNA.

O ciclo de temperaturas adotadas no termociclador Eppendorf Mastercycler® obedeceu às seguintes condições: anelamento inicial a 25°C por 10min, seguido de extensão a 37°C por 120min. As amostras foram então incubadas a 85°C por 5min para a inativação da enzima e mantidas à 4°C até a retirada do aparelho. O cDNA foi mantido a -20° C antes de prosseguir com o PCR quantitativo.

### 3.5.9 Reação de qPCR

A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi realizada pela técnica de qPCR, cujo princípio do método baseia-se na detecção da fluorescência no tubo de reação à medida que duplas fitas de DNA são geradas. A reação de PCR em tempo real foi preparada utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) para um volume final de 12,5µL, contendo 10pmol/µL de cada *primer* (anteriormente descritos na tabela 6) e 2µL do cDNA ([1,25ng/µL]). As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, em dois ensaios independentes, acompanhadas de um controle de ausência de contaminação de material genético, utilizando o termociclador 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems™), com a seguinte programação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos por 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. Após o alongamento final, as amostras foram submetidas à uma variação de temperaturas de 50 a 95°C, com um aumento gradual de 0,5°C/s para determinação da temperatura de dissociação, especificidade dos *primers* e possíveis produtos inespecíficos, garantindo a formação de um único produto (única sequência de DNA) de acordo com as informações técnicas do fabricante.

### 3.5.10 Análise da expressão gênica

Considerando uma eficiência de 100% dos *primers*, a expressão relativa dos genes-alvo foi obtida pelo método do Ct (*threshold cycle*) comparativo, também denominado delta delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), segundo Pfaffl (2001) e Livak & Schmittgen (2001). Neste modelo matemático, o valor de  $\Delta Ct$  foi obtido pela subtração do valor de cada gene-alvo pelo valor da média de Ct do gene *rhoB* (controle interno); o valor de  $\Delta\Delta Ct$  foi obtido pela subtração do valor da média de Ct da amostra desconhecida pelo valor da média de Ct da amostra de referência (ATCC 19606). O valor da

Quantificação Relativa final (QR) foi obtido pela elevação negativa do valor de  $\Delta\Delta C_t$  na base 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Dessa maneira, o resultado da expressão relativa indica quantas vezes um gene é expresso em uma amostra, em relação à expressão desse mesmo gene para a cepa utilizada como referência (ATCC 19606). Os sistemas de efluxo AdeABC, AdeFGH e AdeIJK foram considerados hiperexpressos quando os níveis transcricionais de *adeB*, *adeG* e *adeJ* foram pelo menos 4 vezes maiores em relação à expressão dos genes na amostra de referência ATCC 19606 (YOON; COURVALIN; GRILLOT-COURVALIN, 2013). A redução na expressão da porina *carO* foi considerada positiva quando sua expressão foi de  $\geq 2$  vezes em relação à cepa ATCC 19606 (FONSECA et al., 2013).

### 3.5.11 Caracterização das amostras bacterianas pela técnica de sequenciamento de múltiplos loci - *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

As amostras de *A. baumannii* previamente avaliadas pela técnica de PFGE foram tipadas pela técnica de sequenciamento de MLST, segundo esquema desenvolvido pela Universidade de Oxford (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) (BARTUAL et al., 2005). O método é baseado na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* de *A. baumannii*: *Citrate synthase* (*gltA*); *DNA gyrase subunit B* (*gyrB*); *Glucose dehydrogenase B* (*gdhB*); *Homologous recombination factor* (*recA*); *60-kDa chaperonin* (*cpn60*); *Glucose-6-phosphate isomerase* (*gpi*); *RNA polymerase sigma fator* (*rpoD*).

A metodologia foi realizada seguindo orientações do website ([https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers\\_Oxford.shtml](https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Oxford.shtml)), utilizando os *primers* e condições descritas na tabela 7. Os alelos e STs obtidos de cada amostra avaliada foram comparados com os alelos e STs de todas as linhagens disponibilizadas no banco de dados MLST para *A. baumannii*.

**Tabela 7.** *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *housekeeping* para análise por *Multilocus Sequence Typing*

Gene alvo <sup>1</sup>	Primer	Sequência (5' – 3')	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>gltA</i>	Citrato F1	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	61	722
	Citrato R12	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> _F	TGAAGGCGGCTTATCTGAGT	55	594
	<i>gyrB</i> _R	GCTGGGTCTTTTTCCTGACA		
<i>gdhB</i>	<i>gdhB</i> sec F	ACCACATGCTTTGTTATG	52	774
	<i>gdhB</i> sec R	GTTGGCGTATGTTGTGC		
<i>recA</i>	RA1	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	57	425
	RA2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		

<i>cpn60</i>	cpn60_F	GGTGCTCAACTTGTTTCGTGA	55	640
	cpn60_R	CACCGAAACCAGGAGCTTTA		
<i>gpi</i>	gpi_F	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	55	456
	gpi_R	TCAGGAGCAATACCCCACTC		
<i>rpoD</i>	rpoD-F	ACCCGTGAAGGTGAAATCAG	55	672
	rpoD-R	TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT		

<sup>1</sup>Referências dos primers MLST: Universidade de Oxford. Disponível em *Acinetobacter baumannii* MLST website: (<https://pubmlst.org/abaumannii/>).

### 3.5.12 Purificação e sequenciamento

Após a amplificação dos genes *housekeeping*, realizou-se uma segunda eletroforese em gel de agarose. Depois da visualização das bandas correspondentes, estas foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi, e submetidas ao procedimento de purificação utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

O sequenciamento genético foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA, utilizando de 30 a 60 ng do DNA obtido após purificação. Os resultados foram analisados utilizando o programa Geneious 9.1.3 e comparados com os dados disponíveis no website [https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers\\_Oxford.shtml](https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Oxford.shtml). A construção dos grupos de similaridade entre os STs foi realizada pelo goeBURST (disponível em: <http://goeburst.phyloviz.net/>).

## 3.6 Avaliação da produção de Biofilme

Os ensaios de produção de biofilme foram realizados com sete amostras clínicas (pulsotipos A, B, C, D, F, G) e três ambientais (pulsotipos E, G, H) selecionadas de acordo com os diferentes perfis clonais obtidos previamente através da técnica de PFGE. Como controle positivo foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 e como controle negativo apenas o meio de cultura sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada segundo o protocolo proposto por Rodríguez-Baño e colaboradores (2008) com algumas modificações, conforme descrito abaixo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em 3 ensaios independentes.

### 3.6.1 Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *A. baumannii* foi suspensa em 20 mL de caldo TSB, seguindo-se incubação a 37°C, durante 18 horas (*overnight*), sob agitação a 120 rpm.

### 3.6.2 Ensaio de adesão à superfície inerte

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ( $\sim 10^9$  células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente  $10^7$  células/mL em caldo TSB. 200  $\mu$ L dessa suspensão de células foram transferidas para microplaca de poliestireno estéril com 96 poços, utilizando-se 3 poços para cada amostra testada. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em agar TSA para enumeração das células.

### 3.6.3 Contagem de células viáveis no biofilme

Foram realizados dois ensaios diferentes para formação de biofilme, um para enumeração de células viáveis do biofilme e outro para quantificação de biomassa. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ( $\sim 10^9$  células/mL) foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente  $10^7$  células/mL. Para cada amostra, 200  $\mu$ L dessa suspensão de células foi inoculada em 3 poços da microplaca de poliestireno estéril. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*) por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

### 3.6.4 Produção de biomassa

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria teste foi inoculada em 8 poços da placa. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril e, em seguida, os poços foram preenchidos com metanol por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas secas em posição invertida à temperatura ambiente. Em seguida, 200  $\mu$ L de uma solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados vigorosamente com água destilada estéril e secos à temperatura ambiente. 200  $\mu$ L de solução de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por 10 minutos. 100  $\mu$ L da solução de cristal violeta solubilizada foram transferidos para nova placa e a absorbância avaliada em leitor de microplacas a 570 nm com solução de ácido acético 33% como branco.

### 3.6.5 Classificação do biofilme

Após o experimento de quantificação da biomassa por cristal violeta, as amostras foram classificadas nas categorias de não produtor, fraco produtor, moderado produtor e forte produtor de biofilme, de acordo com os critérios descritos por Saxena e colaboradores (2014) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Critérios para classificação da produção de biofilme

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO_i^1 \leq DO_c^2$	Não produtor
$DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$	Fraco produtor
$2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$	Moderado produtor
$4 \times DO_c < DO_i$	Forte produtor

Valor de *cut-off* da densidade ótica (DO): média da DO controle negativo + 3x desvio padrão; <sup>1</sup>DO<sub>i</sub> da amostra; <sup>2</sup>DO<sub>c</sub> do controle negativo.

### 3.6.6 Formação de biofilme em esferas de vidro e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras Ab13, clínica, e Ab15, ambiental, foram selecionadas para a análise da arquitetura dos biofilmes bacterianos em esferas de vidro por MEV, após resultados individuais nos ensaios de adesão e formação de biofilme em placas de poliestireno.

Seguiu-se o mesmo procedimento do ensaio de formação de biofilme, porém, para MEV, foram inseridas duas esferas de vidro padronizadas de 0,5 cm de diâmetro para cada amostra, uma por poço. Após formação de biofilme, as esferas foram fixadas em solução de glutaraldeído/paraformaldeído 2,5% a 4°C por 18 horas; lavadas em solução PBS (pH 7,4) por três vezes; armazenadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a temperatura ambiente; lavadas novamente em solução PBS (pH 7,4) por três vezes; desidratadas em álcool 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (3 vezes), por 20 minutos cada, à temperatura ambiente, e em seguida levadas ao procedimento de secagem (ponto crítico). As esferas foram metalizadas com ouro na espessura de 20 nm, visualizadas e fotografadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura CARL ZEISS MOD EVO MA10 disponível no Laboratório de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química da UFU (FEQ-UFU).

### 3.7 Sequenciamento e montagem do genoma

O sequenciamento completo do genoma foi realizado em uma amostra clínica (clone A) e uma ambiental (clone H) de *A. baumannii*.

#### 3.7.1 Preparo do DNA genômico e sequenciamento

Inicialmente, a extração de DNA das amostras selecionadas foi realizada através do kit comercial PureLink® Genomic DNA mini Kit – Invitrogen (Applied Biosystems by Life Technologies Co, Foster City, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir da plataforma NextSeq 500 (Illumina) utilizando leituras *paired-end* de 150 pb no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-GENIAL) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### 3.7.2 Montagem dos dados

Os arquivos gerados a partir do sequenciamento foram submetidos a uma montagem *de novo* (sem o uso de um genoma de referência) utilizando os programas Geneious 9.1.3 e Velvet 5.0.1, gerando sequências contíguas (*contigs*) que foram avaliadas usando métricas clássicas descritas por Salzberg e colaboradores (2012).

Os *contigs* foram comparados com dados genômicos do banco de nucleotídeos não redundante do NCBI, a partir do algoritmo megablast do programa BLAST 2.2.28 (ALTSCHUL et al., 1990). Além disso, foi possível identificar contaminantes e separar produtos pertencentes ao cromossomo e/ou plasmídeos, baseando-se no melhor *Hit* de BLAST e gerando conjuntos de *contigs*. Posteriormente, foi aplicada a metodologia híbrida descrita por Cerdeira e colaboradores (2011), com modificações.

#### 3.7.3 Análises *in silico*

A metodologia *in silico* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cerdeira e colaboradores (2011), e se baseia no tratamento de dados, montagem, anotação, validação da montagem, fechamento de gaps *in silico* de genomas bacterianos.

O *Sequence Type* das amostras foi determinado a partir de uma ferramenta *on-line* denominada MultiLocus Sequence Typing (MLST 1.8), acesso em <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>. Adicionalmente, os genes de resistências e virulência foram identificados utilizando-se a ferramenta *on-line* ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e VirulenceFinder 1.4

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>), respectivamente. Foi determinado também o grupo de incompatibilidade do plasmídeo por comparação da sequência da origem de replicação com o banco de dados depositados no NCBI utilizando-se o algoritmo BLASTn do BLAST em conjunto com o PlasmidFinder. Regiões contendo repetições invertidas, elementos móveis e origem de replicação do plasmídeo, foram identificadas usando o programa Geneious 9.1.3 e o programa ISFinder.

A anotação automática dos genomas foi inicialmente realizada utilizando-se o Geneious 9.1.3, e os dados finais do genoma foram submetidos e anotados por um banco de dados de domínio público (NCBI de genomas bacterianos).

### 3.8 Comitê de ética

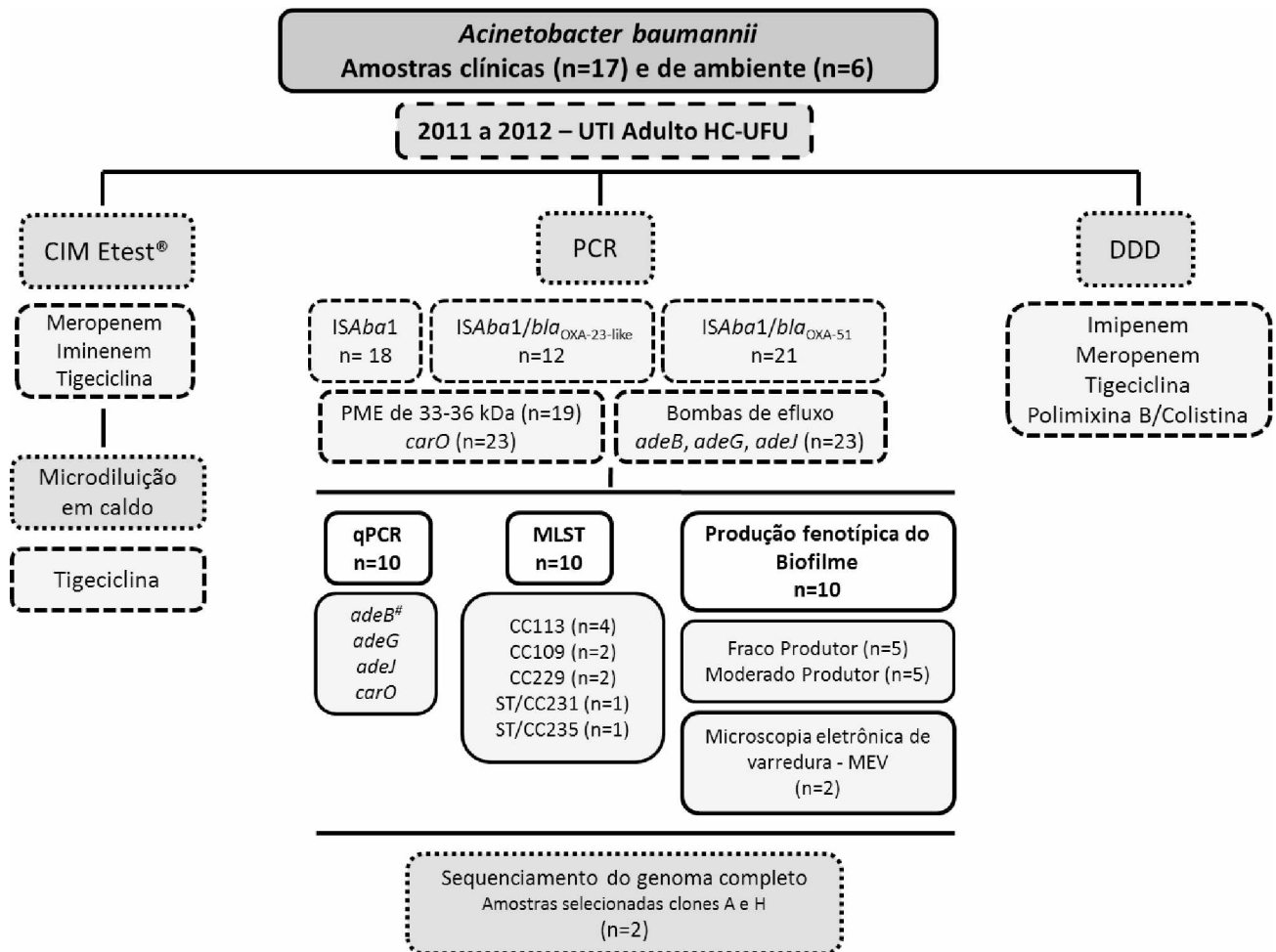
As amostras de *A. baumannii* utilizadas nesse estudo fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia Molecular, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU sob o número de protocolo 228/11 (Anexo II).

### 3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95% e foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4- RESULTADOS

Durante o período de maio de 2011 a junho de 2012, foram selecionadas aleatoriamente 23 amostras de *A. baumannii*, 17 recuperadas de aspirado traqueal de 16 pacientes com PAV por *A. baumannii* internados na UTI de Adultos do HC-UFU e seis de superfícies ambientais (mesa de cabeceira, n=1; grade da cama, n=5). Dezenove amostras foram resistentes e quatro sensíveis aos carbapenêmicos. Os resultados preliminares estão resumidos na figura 1.



**Figura 1.** Organograma representativo dos testes realizados nas amostras clínicas e de ambiente de *A. baumannii*.  
#Hiperexpressão de *adeB*.

As características das amostras utilizadas no estudo estão descritas na Tabela 2. Observou-se que todas apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, utilizado como marcador taxonômico de espécie, e 20, das 23 amostras analisadas, apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Entre as 23 amostras submetidas previamente à técnica de PFGE (ROYER et al., 2015), foram identificados oito genótipos (A – H), sendo o genótipo A (n=9; 52,9% das amostras clínicas) e o H (n=4; 66,6% das amostras de ambiente) os mais frequentes.

Baseado nos testes de sensibilidade aos antibióticos, nove antibiotipos (R1-R9) foram determinados entre as 23 amostras, com seis classificadas como do antibiotipo R1 e sete do antibiotipo R6, todas correspondentes com o perfil XDR. No total, a maioria (18/23; 78,3%) das amostras apresentaram-se como XDR (Tabela 9).

A tabela 10 caracteriza as amostras de *A. baumannii* quanto aos seus determinantes de resistência, incluindo a presença dos genes de oxacilinas e sua associação ou não com a sequência

de inserção *ISAbal*, presença dos genes para porinas e bombas de efluxo, além da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para carbapenêmicos (imipenem/meropenem) e tigeciclina através da metodologia do Etest<sup>®</sup>. A maioria (6/7; 85,7%) das amostras classificadas como do antibiotipo R6 apresentaram todos os genes de resistência avaliados. A presença da sequência de inserção *ISAbal* foi frequente, presente em 78,3% (18/23) das amostras testadas. A associação *ISAbal*/OXA-51 e *ISAbal*/OXA-23 foi observada em 21 (91,3%) e em 12 (52,2%) amostras, respectivamente. Todas as amostras ambientais analisadas apresentaram o elemento de inserção *ISAbal* ligado tanto ao gene *bla*<sub>OXA-51</sub> quanto ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub>.

Foi detectada por PCR a presença dos genes das PME, *carO* e *pme33-36*, com frequências de 82,6% (19/23) e 100%, respectivamente. A presença dos genes que expressam as bombas de efluxo AdeABC (*adeB*), AdeFGH (*adeG*) e AdeIJK (*adeJ*) foi evidenciada em todas as amostras analisadas (Tabela 10).

De acordo com os perfis de resistência liberados pelo sistema automatizado VITEK 2<sup>®</sup>, apesar de cinco amostras não apresentarem CIM para meropenem por essa técnica, podemos confirmar que 14 amostras clínicas comportaram-se como resistentes aos carbapenêmicos, considerando o resultado para o imipenem, enquanto três foram sensíveis (Tabela 11). Esses resultados foram confirmados pela técnica de Etest<sup>®</sup>, exceto para a amostra 9/AT. As seis amostras de ambiente foram resistentes aos carbapenêmicos, com CIMs muito elevadas. Comparando os resultados obtidos nos dois testes para tigeciclina, as amostras analisadas pelo VITEK 2<sup>®</sup> mostraram discrepância em 10 deles, ou seja, o resultado foi liberado como sensível pelo VITEK 2<sup>®</sup>, mas foram resistentes pelo Etest<sup>®</sup>. A fim de confirmar esses resultados, foi realizada a microdiluição em caldo (MD) para tigeciclina, teste considerado padrão ouro, e todas as amostras foram classificadas como resistentes a este antimicrobiano (Tabela 11).

**Tabela 9.** Origem e características das amostras de *A. baumannii*, contendo a classificação de acordo com o resistograma e o fenótipo MDR e XDR

Amostras	Origem	Data de isolamento	Perfil de resistência	Resistograma	XDR <sup>a</sup> /MDR <sup>b</sup>	Genótipo de Oxacilinase <sup>c</sup>	Perfil PFGE <sup>d</sup>
1	Aspirado traqueal	09/05/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
2	Aspirado traqueal	11/08/2011	CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R4	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
3	Aspirado traqueal	19/08/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
4	Aspirado traqueal	29/08/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
5	Aspirado traqueal	14/10/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	D
6	Aspirado traqueal	31/12/2011	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
7	Aspirado traqueal	17/01/2012	AMI; APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R1	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
8	Aspirado traqueal	11/02/2012	APS; CPM; CIP; GEN; IPM; TGC	R2	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
9	Aspirado traqueal	17/03/2012	APS; CPM; CIP; TGC	R7	MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	C
10	Aspirado traqueal	03/05/2012	APS; CPM; CIP; IPM; TIG	R5	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	B
11	Aspirado traqueal	19/06/2012	APS; CPM; CIP; IPM; TGC	R5	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
12	Aspirado traqueal	25/06/2012	AMI; APS; CPM; CIP; IPM; TGC	R3	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	C
13	Aspirado traqueal	02/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	A
14	Aspirado traqueal	27/06/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	G
15	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
16	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
17	Superfície	18/10/2011	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
18	Superfície	07/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	G
19	Superfície	15/02/2012	APS; CPM; GEN; IPM; TGC	R6	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	H
20	Superfície	11/05/2012	APS; CPM; IPM; TIG	R8	MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>+</sup>	E
21	Aspirado traqueal	22/02/2012	CPM; CIP; TGC	R9	NÃO-MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	G
22	Aspirado traqueal	10/01/2012	CPM; CIP; TGC	R9	NÃO-MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	F
23	Aspirado traqueal	26/12/2011	APS; CPM; CIP; TGC	R7	MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> <sup>+</sup> / <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> <sup>-</sup>	G

<sup>a</sup>MDR, multirresistente; <sup>b</sup>XDR, extensivamente resistente; <sup>c</sup>Todas amostras negativas para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>; <sup>d</sup>PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. AMI, amicacina; APS, ampicilina-sulbactam; CPM, cefepime; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IPM, Imipenem; MER, meropenem; TGC, Tigeciclina.

**Tabela 10.** Caracterização molecular dos determinantes de resistência e avaliação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para carbapenêmicos e tigeciclina em 23 amostras de *A. baumannii*, recuperadas de aspirado traqueal e ambiente, da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de adultos, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU)

Amostras <sup>a</sup> / Origem	Genes de resistência	Genes de porinas	Genes de bombas de efluxo	CIM <sup>b</sup> (µg/mL) IPM <sup>c</sup> /MER <sup>d</sup>	CIM <sup>b</sup> (µg/mL) TGC <sup>e</sup>	CIM <sup>f</sup> (µg/mL) TGC	Perfil de PFGE <sup>g</sup>
13/AT <sup>h</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	>256	64	A
15/SP <sup>i,j</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	96	64	H
17/SP <sup>k</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	48	64	H
20/SP <sup>k</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	24	64	E
2/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	24/>32	>256	64	A
16/SP <sup>k</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	24/>32	96	64	H
18/SP <sup>k</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	16/>32	64	64	G
19/SP <sup>k</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	12/32	48	64	H
1/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	12/16	>256	64	A
9/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	4/3	8	64	C
5/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	8/12	48	64	D
3/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	>256	64	A
12/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	24	64	C
8/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	24/32	64	64	A
6/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	16/24	256	64	A
11/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	8/6	>256	64	A
14/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-23</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	256	64	G
4/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	>256	64	A
10/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	32	32	B
7/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	16/>32	24	32	A
23/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	1/3	128	64	G
21/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	0,75/3	6	64	G
22/AT	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>ISAbal</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	3/6	8	64	F

<sup>a</sup>Todas amostras negativas para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>; <sup>b</sup>Concentração Inibitória Mínima - Etest<sup>®</sup>; <sup>c</sup>Imipenem (0,002 - 32µg/mL); <sup>d</sup>Meropenem (0,002 - 32µg/mL); <sup>e</sup>Tigeciclina (0,016 - 256µg/mL); <sup>f</sup>Concentração Inibitória Mínima - Microdiluição em caldo (0,125 - 256µg/mL); <sup>g</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis; <sup>h</sup>AT, Aspirado traqueal; <sup>i</sup>SP, Superfície; <sup>j</sup>, mesa de cabeceira; <sup>k</sup>, grade da cama.

**Tabela 11.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para carbapenêmicos e tigeciclina obtidos através de análise pelo sistema automatizado VITEK 2<sup>®</sup>, Etest<sup>®</sup> e microdiluição em caldo (MD), para amostras de *A. baumannii* de origem clínica e ambiental

Amostras	Origem	VITEK 2 <sup>®</sup> /CIM <sup>a</sup> (µg/mL)			Etest <sup>®</sup> /CIM <sup>a</sup> (µg/mL)			MD <sup>f</sup> /CIM <sup>a</sup> (µg/mL)
		Imipenem	Meropenem	Tigeciclina	Imipenem <sup>c</sup>	Meropenem <sup>d</sup>	Tigeciclina <sup>e</sup>	Tigeciclina <sup>g</sup>
1	Aspirado traqueal	≥16	ND <sup>b</sup>	≥8	12	16	>256	64
2	Aspirado traqueal	≥16	ND	ND	24	>32	>256	64
3	Aspirado traqueal	≥16	ND	≥8	>32	>32	>256	64
4	Aspirado traqueal	≥16	ND	≥8	>32	>32	>256	64
5	Aspirado traqueal	≥16	ND	2	8	12	48	64
6	Aspirado traqueal	≥16	≥16	≥8	16	24	256	64
7	Aspirado traqueal	≥16	≥16	2	16	>32	24	32
8	Aspirado traqueal	≥16	≥16	2	24	32	64	64
9	Aspirado traqueal	≥16	≥16	2	4	3	8	64
10	Aspirado traqueal	≥16	≥16	1	>32	>32	32	32
11	Aspirado traqueal	≥16	≥16	ND	8	6	>256	64
12	Aspirado traqueal	≥16	≥16	2	>32	>32	24	64
13	Aspirado traqueal	≥16	≥16	ND	>32	>32	>256	64
14	Aspirado traqueal	≥16	≥16	2	>32	>32	256	64
15	Superfície	--	--	--	>32	>32	96	64
16	Superfície	--	--	--	24	>32	96	64
17	Superfície	--	--	--	>32	>32	48	64
18	Superfície	--	--	--	16	>32	64	64
19	Superfície	--	--	--	12	32	48	64
20	Superfície	--	--	--	>32	>32	24	64
21	Aspirado traqueal	≤1	1	2	0,75	3	6	64
22	Aspirado traqueal	4	4	1	3	6	8	64
23	Aspirado traqueal	≤1	1	2	1	3	128	64

<sup>a</sup>CIM, concentração inibitória mínima; <sup>b</sup>ND, não determinado; <sup>c</sup>Imipenem (0,002 - 32µg/mL); <sup>d</sup>Meropenem (0,002 - 32µg/mL); <sup>e</sup>Tigeciclina (0,016 - 256µg/mL); <sup>f</sup>MD, Microdiluição em caldo; <sup>g</sup>(0,125 - 256µg/mL).

Os dados de consumo de Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina, na UTI de Adultos do HC-UFU, expressos como Dose Diária Definida (DDD) por 1000 pacientes-dia, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 estão na tabela 12. O consumo destes antibióticos, durante o período investigado, variou nos intervalos avaliados, entretanto, o uso de meropenem, tigeciclina e polimixina B/colistina aumentaram consideravelmente a partir de agosto de 2012, o que não foi observado para o imipenem.

**Tabela 12.** Dados de consumo dos antibióticos Imipenem, Meropenem, Tigeciclina e Polimixina B/Colistina, na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), expressos como Dose Diária Definida (DDD) por 1000 pacientes-dia, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012

Mês/Ano	DDD/1000 pacientes-dia			
	Imipenem	Meropenem	Tigeciclina	Polimixina B/ Colistina
janeiro/11	52,4	98,7	0,0	45,5
fevereiro/11	83,3	54,2	7,1	25,4
março/11	50,8	91,1	20,4	14,7
abril/11	35,8	71,7	0,0	3,0
maio/11	43,3	76,6	16,7	41,9
junho/11	59,4	78,3	5,6	15,2
julho/11	41,4	158,6	2,7	39,8
agosto/11	90,1	168,0	5,4	19,0
setembro/11	51,1	101,9	27,2	50,7
outubro/11	98,1	218,5	28,0	41,6
novembro/11	96,4	162,2	0,0	8,1
dezembro/11	130,9	94,1	7,5	24,7
janeiro/12	163,2	157,8	0,0	37,3
fevereiro/12	64,0	156,5	0,0	39,7
março/12	99,5	117,7	20,4	34,0
abril/12	85,3	83,3	52,8	44,8
maio/12	112,1	92,7	32,8	68,8
junho/12	28,3	83,1	11,7	19,6
julho/12	82,0	187,9	0,0	51,2
agosto/12	115,9	269,9	31,2	103,6
setembro/12	53,9	206,4	63,3	105,2
outubro/12	78,2	256,5	102,2	76,7
novembro/12	61,1	204,7	86,7	55,6
dezembro/12	55,9	184,7	66,7	22,2

A distribuição espacial/temporal das 23 amostras recuperadas de *A. baumannii* da UTI de Adultos, com base nos perfis clonais, é apresentada na figura 2, assim como as demais amostras clínicas e de superfície não tipadas por PFGE, mas resistentes aos carbapenêmicos. Observou-se uma frequência maior de amostras resistentes aos carbapenêmicos associadas à PAV na UTI I e II quando comparadas com as demais, assim como na distribuição dos clones. O clone dominante detectado (clone A) estava disseminado em toda a UTI, independente da data do isolamento.



**Figura 2.** Planta baixa da UTI de Adultos do HC-UFU. Os clones obtidos estão apresentados em cores diferentes e listados a partir da data de isolamento da amostra no respectivo leito do paciente. Também, estão incluídas amostras clínicas e de ambiente/superfície, não tipadas por PFGE, mas resistentes aos carbapenêmicos.

De acordo com os perfis clonais obtidos através da técnica de PFGE (clones A – H), representativos de amostras clínicas e ambientais, foram selecionadas dez amostras de *A. baumannii* para as análises por PCR em tempo real (qPCR), análise fenotípica da produção de biofilme e MLST, cujas características estão apresentadas na tabela 13.

Através da técnica de qPCR, foi realizada a quantificação da expressão dos genes *adeB* (AdeABC), *adeG* (AdeFGH) e *adeJ* (AdeIJK), que codificam componentes dos sistemas de efluxo da superfamília RND (*Resistance Nodulation Division*), e do gene codificador da PME de 29 kDa (*carO*), e comparados com a expressão da cepa *A. baumannii* ATCC 19606. A expressão gênica relativa das amostras testadas em comparação à de referência está demonstrada na tabela 14 e na figura 3. Na tabela 14, baseado no nível de transcrição determinado como *cut-off* para a hiperexpressão das bombas de efluxo e da porina, observou-se que somente o gene *adeB*, que codifica a produção da bomba de efluxo AdeABC, foi considerado hiperexpresso porque apresentou nível de transcrição 4 vezes maior em relação ao observado para o gene na amostra de referência. Houve diferença significativa nos níveis de expressão da maioria das amostras em relação ao gene *adeB* (figura 3B), o contrário observado quando da análise dos genes *carO*, *adeG*, e *adeJ* (figuras 3A, 3C e 3D).

**Tabela 13.** Características das 10 amostras de *A. baumannii* selecionadas para análises por qPCR, produção de Biofilme e MLST

Amostra	Origem	Perfil PFGE <sup>a</sup>	MDR <sup>b</sup> /XDR <sup>c</sup>	Genes de resistência	Genes de porinas	Genes de bombas de efluxo	CIM <sup>d</sup> (µg/mL) IPM <sup>e</sup> /MER <sup>f</sup>	CIM <sup>g</sup> (µg/mL) TGC <sup>h</sup>
5	Aspirado traqueal	D	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	8/12	48
9	Aspirado traqueal	C	MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	4/3	8
10	Aspirado traqueal	B	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	32
12	Aspirado traqueal	C	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	24
13	Aspirado traqueal	A	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	>256
15	Superfície	H	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	96
18	Superfície	G	XDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	16/>32	64
20	Superfície	E	MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-23</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	>32/>32	24
21	Aspirado traqueal	G	Não-MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>ISAbal</i> ; <i>ISAbal/OXA-51</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	0,75/3	6
22	Aspirado traqueal	F	Não-MDR	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> ; <i>ISAbal</i>	<i>carO</i> ; 33-36kDa	<i>adeB</i> ; <i>adeG</i> ; <i>adeJ</i>	3/6	8

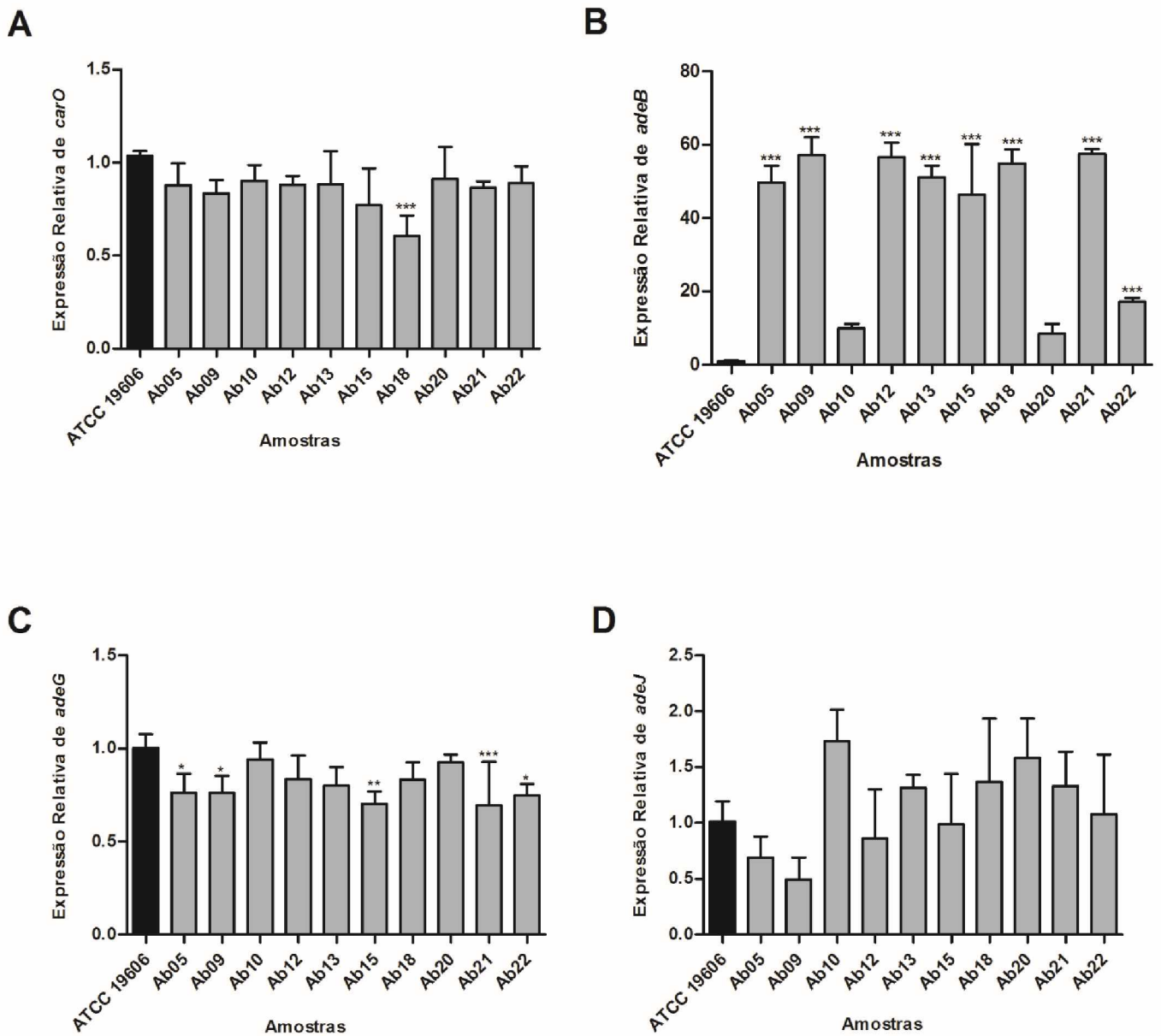
<sup>a</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis ; <sup>b</sup>MDR, multirresistente; <sup>c</sup>XDR, extensivamente resistente; <sup>d</sup>Concentração Inibitória Mínima - Etest<sup>®</sup>; <sup>e</sup>Imipenem (0,002 - 32µg/mL); <sup>f</sup>Meropenem (0,002 - 32µg/mL);

<sup>g</sup>Concentração Inibitória Mínima - Microdiluição em caldo; <sup>h</sup>Tigeciclina (0,125 - 256µg/mL).

**Tabela 14.** Expressão gênica relativa dos genes *adeB*, *adeG*, *adeJ* e *carO* nas 10 amostras de *A. baumannii* em comparação à expressão dos genes na cepa de referência ATCC 19606, analisadas através de qPCR. Ensaios realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

Amostra	Gene			
	<i>adeB</i> *	<i>adeG</i> *	<i>adeJ</i> *	<i>carO</i> <sup>#</sup>
ATCC 19606	1,027	1,003	1,013	1,036
Ab 05	49,76	0,7633	0,6883	0,8767
Ab 09	57,14	0,7633	0,495	0,8333
Ab 10	9,99	0,9417	1,733	0,9017
Ab 12	56,64	0,835	0,8625	0,8825
Ab 13	51,14	0,8	1,315	0,885
Ab 15	46,42	0,7025	0,988	0,772
Ab 18	54,97	0,8317	1,37	0,6067
Ab 20	8,508	0,925	1,582	0,9117
Ab 21	57,47	0,695	1,332	0,866
Ab 22	17,17	0,7467	1,078	0,89

\*Hiperexpressão com nível de transcrição  $\geq 4$  vezes em relação ao observado para o gene na amostra de referência ATCC 19606. <sup>#</sup>Redução de expressão com nível de transcrição  $\geq 2$  vezes em relação à cepa ATCC 19606.



**Figura 3.** Expressão gênica relativa do gene *carO* e dos genes relacionados às três bombas de efluxo (AdeABC, AdeFGH e AdeIJK), determinada por qPCR. Os resultados são apresentados em relação à cepa ATCC 19606 utilizada como referência. Cada amostra foi testada em triplicata, em dois ensaios independentes. Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro). \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , no teste One-way ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni.

Para rastrear a origem das 10 amostras de *A. baumannii*, a tipagem de sequências multilocus dessas cepas foi realizada utilizando o esquema da Universidade de Oxford (PubMLST). A tabela 15 mostra as combinações dos conjuntos de alelos de cada um dos sete *loci* analisados, definindo os STs. A análise dos diferentes alelos mostrou que as amostras pertencentes ao mesmo complexo clonal (CC) variaram apenas no locus *gpi*, sendo consideradas *single-locus variant*. A partir da análise dos alelos foi construída a figura 4, que mostra a população *snapshot* dos STs de *A. baumannii* descritos até o momento, evidenciando a similaridade entre eles e a indicação daqueles detectados neste estudo, bem como de seus respectivos CCs.

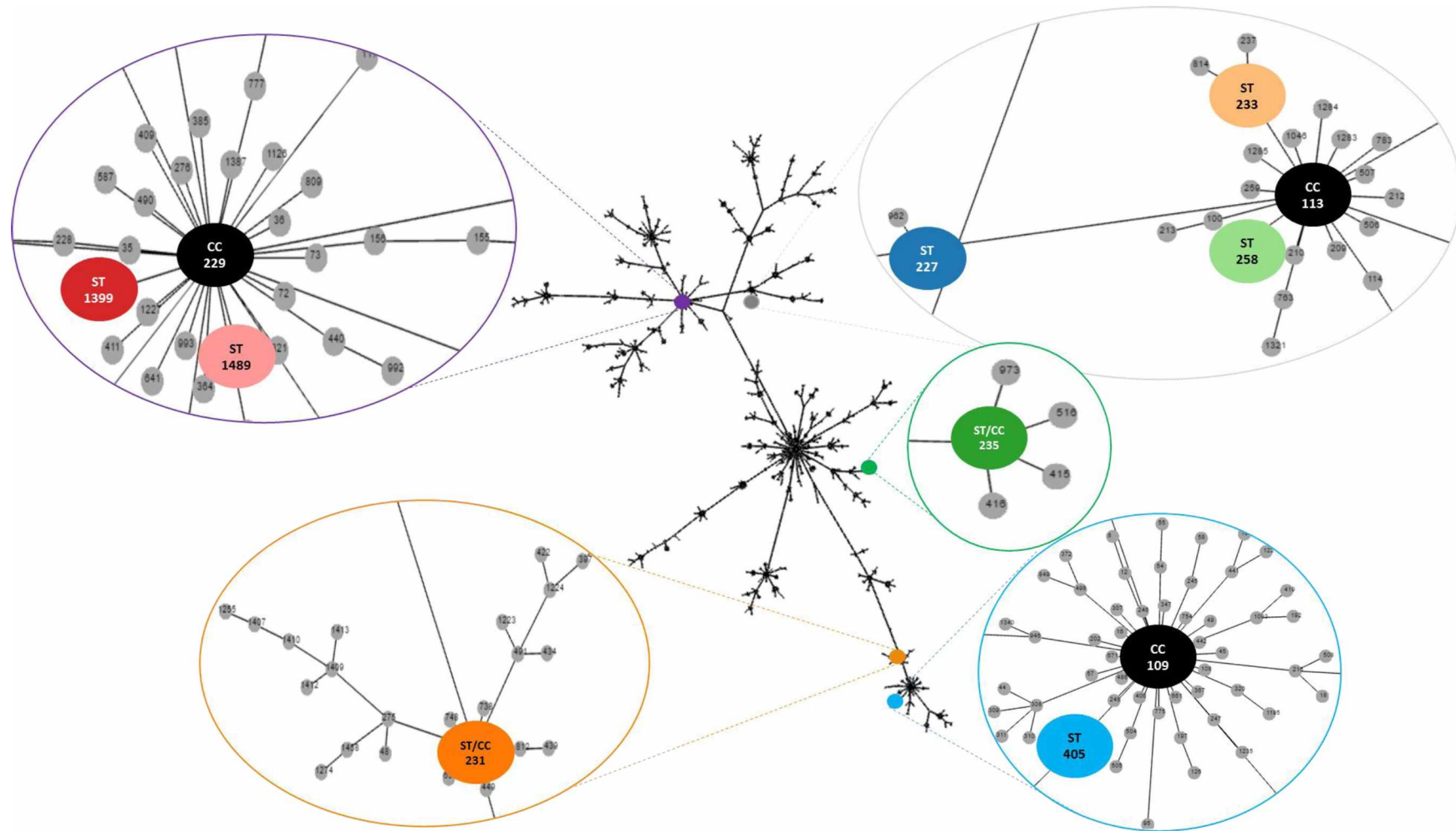
De acordo com o MLST foram determinados oito STs e cinco CCs, distribuídos da seguinte maneira: 1) CC113, ST227 (n=2), ST233(n=1) e ST258 (n=1), 2) CC229, STs 1399 e 1489, 3) CC109, ST 405 (n=2), 4) ST/CC235 e 5) ST/CC231. O ST 1399 é descrito pela primeira vez neste estudo e foi depositado no banco de dados do MLST, disponível no endereço eletrônico: [https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst\\_abaumannii\\_oxford\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_abaumannii_oxford_seqdef), acesso em 22/03/17.

As três amostras do ambiente incluídas nesta análise pertenceram cada uma a complexos clonais distintos: CC229, CC113 e CC109. Os CCs 109 e 113 foram os únicos que apresentaram amostras com mesmo ST tanto de origem ambiental como de espécime clínico.

**Tabela 15.** Conjunto de alelos de cada um dos sete *loci* analisados por MLST (esquema de Oxford), STs e CCs correspondentes

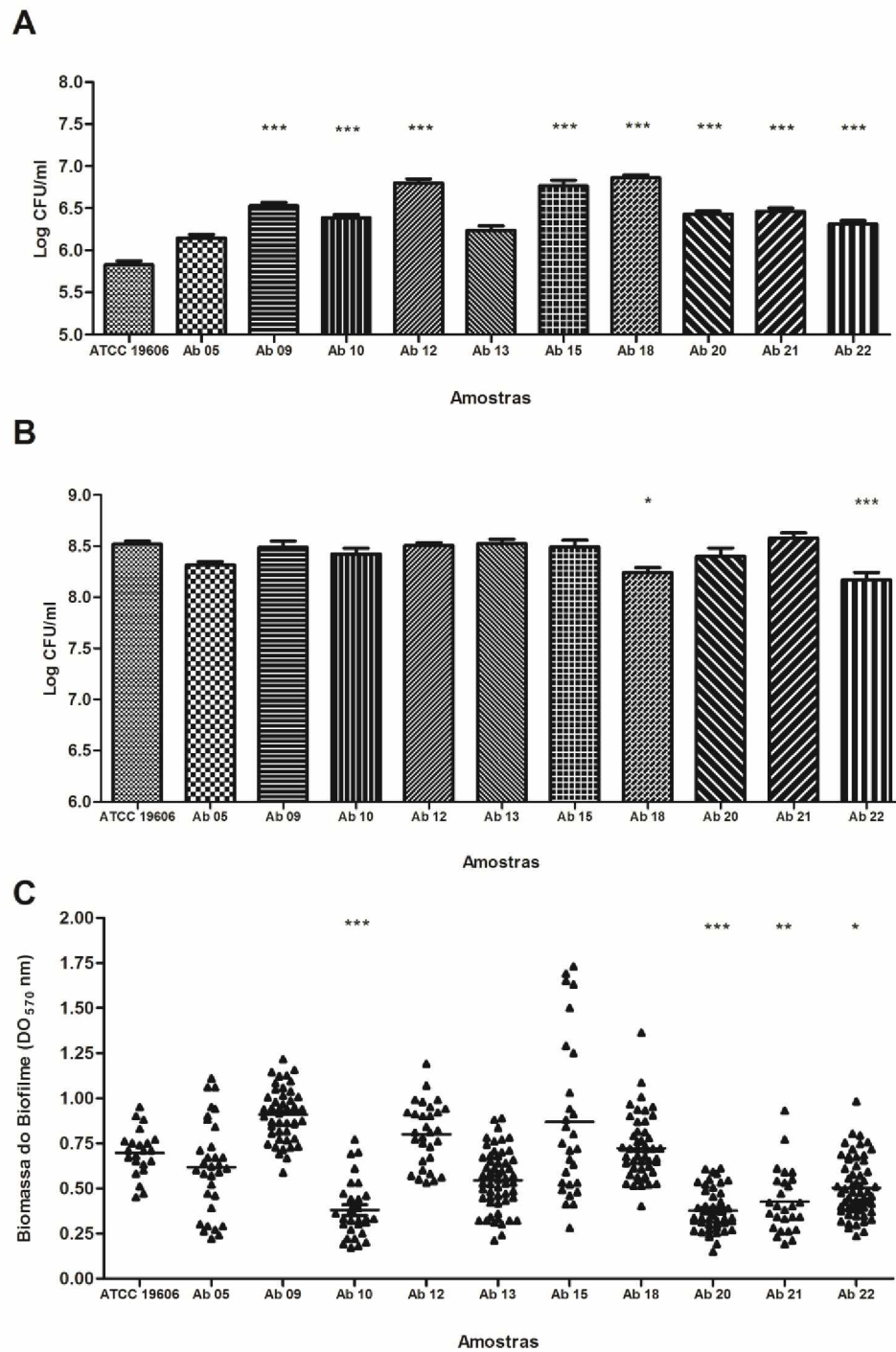
Amostra	PFGE <sup>b</sup>	MLST <sup>a</sup> (Oxford)							ST <sup>c</sup>	CC <sup>d</sup>
		<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cnp60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>		
Ab 05	D	10	12	4	11	4	141	5	405	109
Ab 09	C	1	15	8	10	28	110	32	258	113
Ab 10	B	1	15	2	28	1	263	32	1399 <sup>g</sup>	229
Ab 12	C	1	15	8	10	28	99	32	227	113
Ab 13	A	10	12	4	11	4	98	5	231	231
Ab 15 <sup>e</sup>	H	10	12	4	11	4	141	5	405	109
Ab 18 <sup>e</sup>	G	1	15	8	10	28	99	32	227	113
Ab 20 <sup>e</sup>	E	1	15	2	28	1	283	32	1489	229
Ab 21 <sup>f</sup>	G	1	15	8	10	28	106	32	233	113
Ab 22 <sup>f</sup>	F	1	69	90	2	1	79	30	235	235

<sup>a</sup>Multilocus sequence typing; <sup>b</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis; <sup>c</sup>Sequence Type; <sup>d</sup>Clonal Complex; <sup>e</sup>amostras de superfície; <sup>f</sup>amostras sensíveis aos carbapenêmicos; <sup>g</sup>Novo ST descrito e depositado no banco de dados do MLST, esquema de Oxford, para *A. baumannii* ([https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst\\_abaumannii\\_oxford\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_abaumannii_oxford_seqdef)).



**Figura 4.** Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no software PhyloViz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os *Sequence Types* (STs). Os Complexos Clonais (CCs) e os STs observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores.

Na avaliação da formação de biofilme, todas as cepas estudadas foram capazes de aderir às placas de poliestireno, entretanto, estatisticamente, apenas as amostras Ab05 e Ab13 não diferiram na adesão quando comparadas ao controle positivo *A. baumannii* ATCC 19606 (Fig. 5A). Em relação ao número de células presentes no biofilme, as amostras Ab18 e Ab22 mostraram menor número de células, e não houve diferença significativa na formação de biofilme entre isolados clínicos e ambientais. Apesar disso, duas cepas pertencentes ao clone G, uma clínica (Ab21) e outra ambiental (Ab18), mostraram diferentes comportamentos quando comparados à amostra controle (Fig. 5B). A produção de biofilme também foi avaliada pela determinação da biomassa do biofilme, medida por absorbância óptica a 570 nm, utilizando a metodologia com o corante cristal violeta. As amostras Ab10, Ab20, Ab21 e Ab22 produziram menos biomassa do que a média da densidade de biomassa das amostras e do controle (Fig. 5C).



**Figura 5.** Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 10 amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*. (A) Número de células aderidas em placas de poliestireno após 2 h de contato; (B) Concentração celular do biofilme; (C) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO<sub>570</sub> nm). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , no teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Amostra de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle.

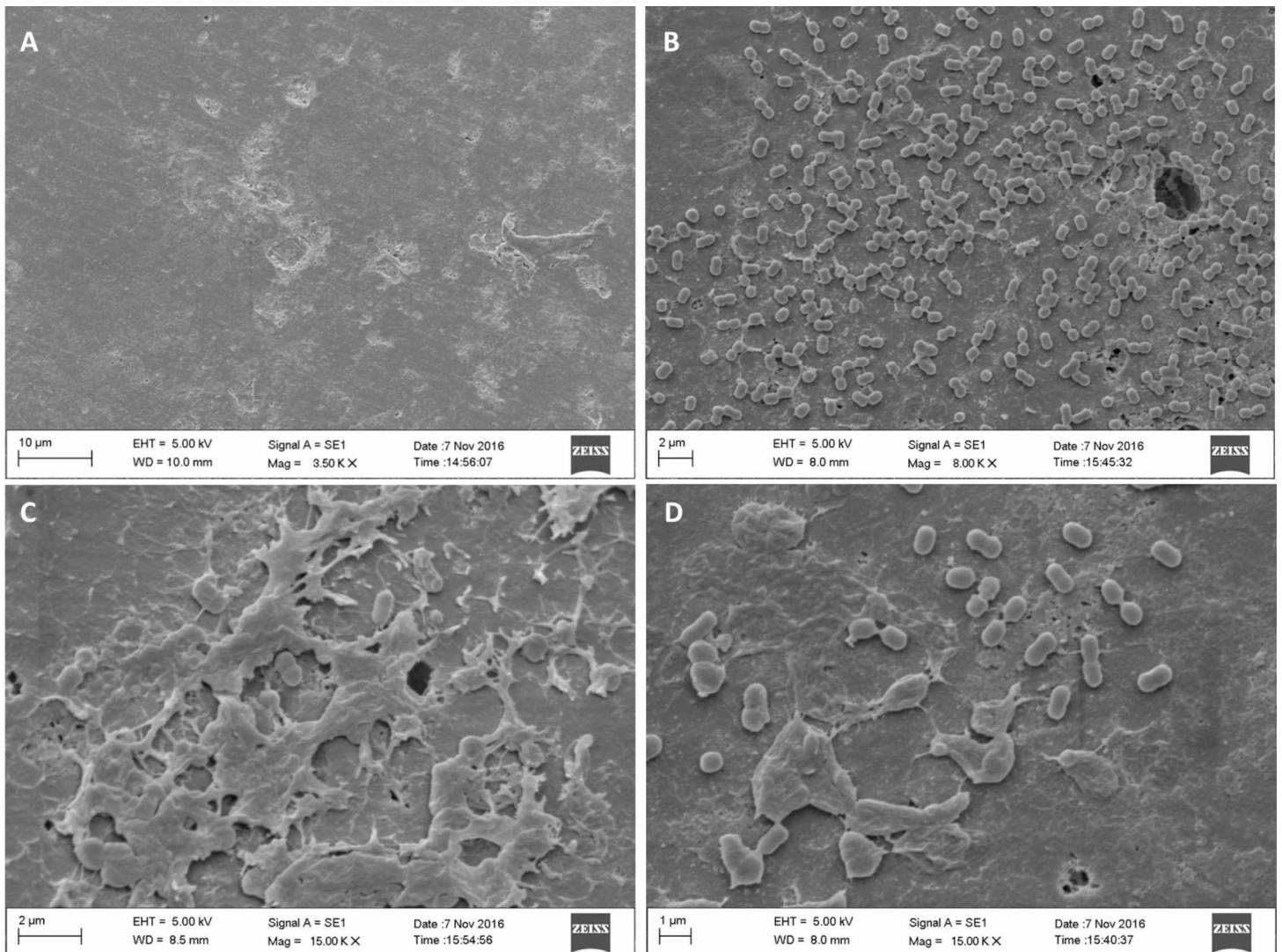
A média da densidade da biomassa do biofilme das amostras de *A. baumannii* foi de 0,622 ( $\pm 0,191$ ). A produção do biofilme, avaliada pelo método quantitativo, revelou que 50% das amostras foram classificadas como produtoras moderadas de biofilme e 50% produtoras fracas. Não foi encontrada relação entre as amostras XDR e MDR e a habilidade de formar biofilme (Tabela 16).

**Tabela 16.** Produção de biofilme e multirresistência de amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*

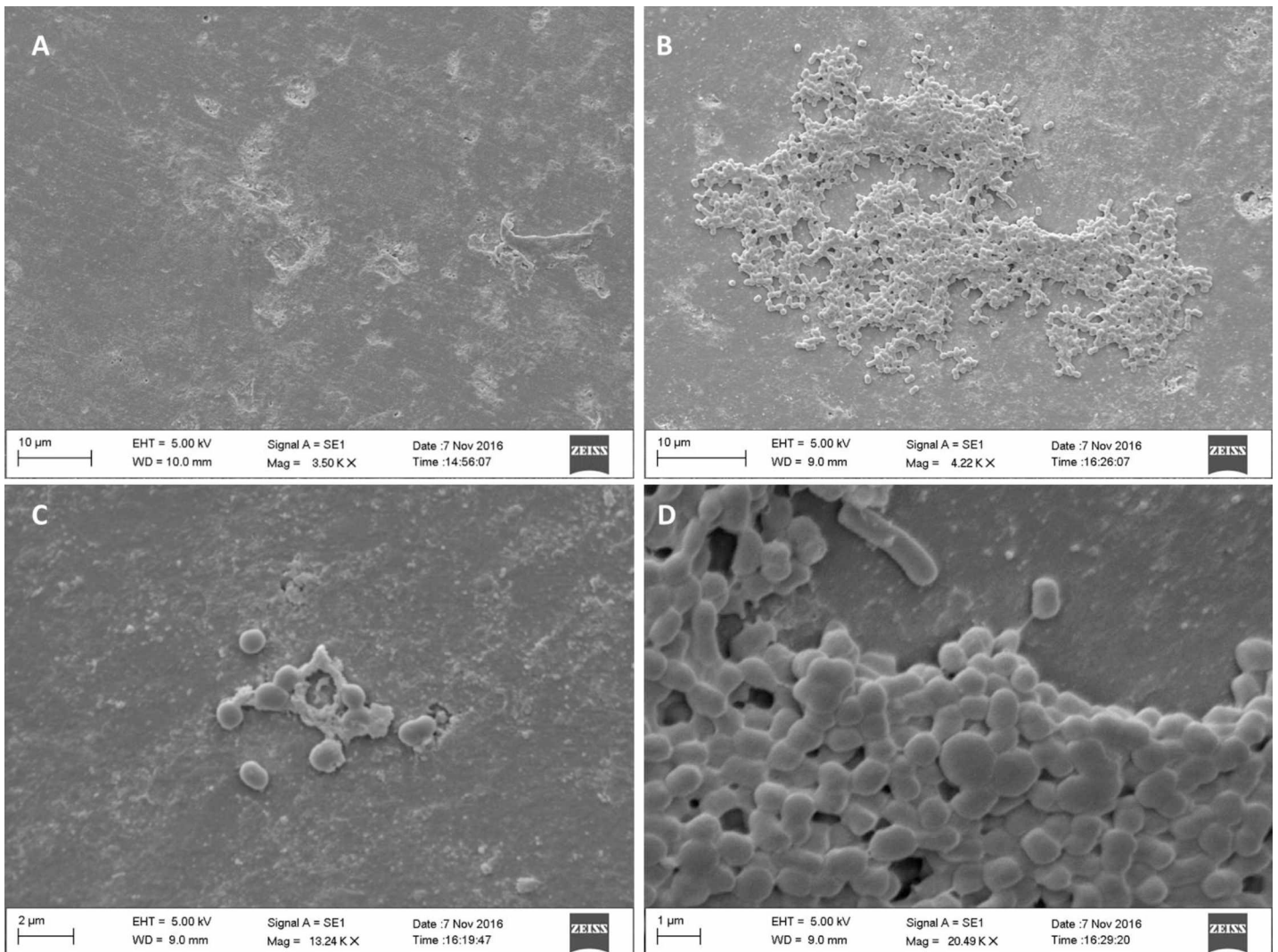
Amostras	D.O. <sup>b</sup>	Produção de Biofilme	MDR <sup>c</sup> /XDR <sup>d</sup>
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 (controle positivo)	0,7	Moderado	--
Ab 05	0,62	Moderado	XDR
Ab 09	0,91	Moderado	MDR
Ab 10	0,38	Fraco	XDR
Ab 12	0,8	Moderado	XDR
Ab 13	0,54	Fraco	XDR
Ab 15 <sup>a</sup>	0,87	Moderado	XDR
Ab 18 <sup>a</sup>	0,72	Moderado	XDR
Ab 20 <sup>a</sup>	0,38	Fraco	MDR
Ab 21	0,43	Fraco	Não-MDR
Ab 22	0,5	Fraco	Não-MDR

<sup>a</sup>Amostras ambientais; <sup>b</sup>Densidade ótica (570 nm) = média da D.O. do controle negativo + 3x o desvio padrão do controle negativo; <sup>c</sup>MDR, multirresistente; <sup>d</sup>XDR, extensivamente resistente.

De acordo com os resultados da produção de biofilme e dos perfis clonais prevalentes obtidos através da técnica de PFGE, foram selecionadas para a realização da MEV as amostras Ab13, clínica, produtora fraca de biofilme, pertencente ao clone A, e Ab15, ambiental, produtora moderada, pertencente ao clone H. As imagens de MEV confirmaram a capacidade destas bactérias de aderir à superfície do vidro, observando-se o crescimento de ambas (figuras 6 e 7), com presença de matriz visível (figuras 6C, 6D, 7B, 7C e 7D), especialmente da segunda, comprovando sua melhor habilidade de produzir biofilme (Figuras 7B, 7C e 7D).

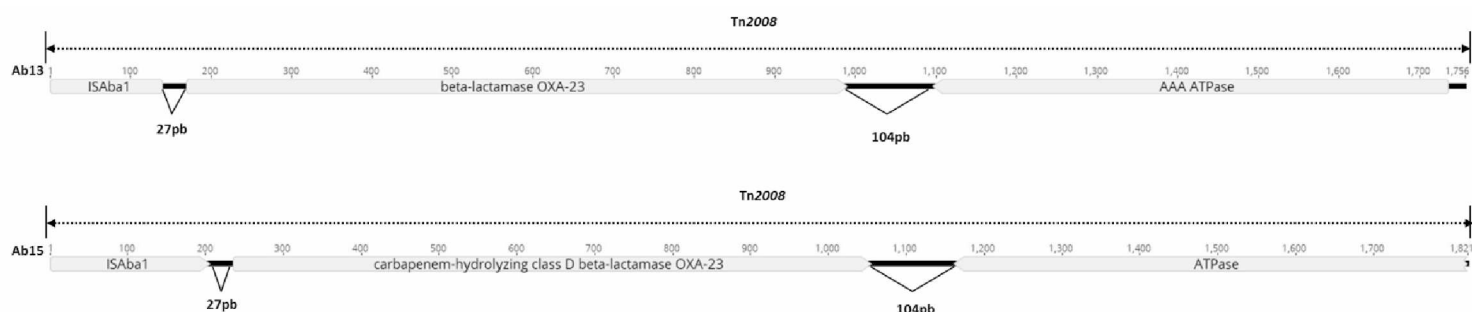


**Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme da amostra clínica de *Acinetobacter baumannii*, Ab13, desenvolvido na superfície de esfera de vidro após 24 horas de incubação. A) Controle negativo. B), C) e D) Formação de biofilme e crescimento bacteriano da amostra Ab13.

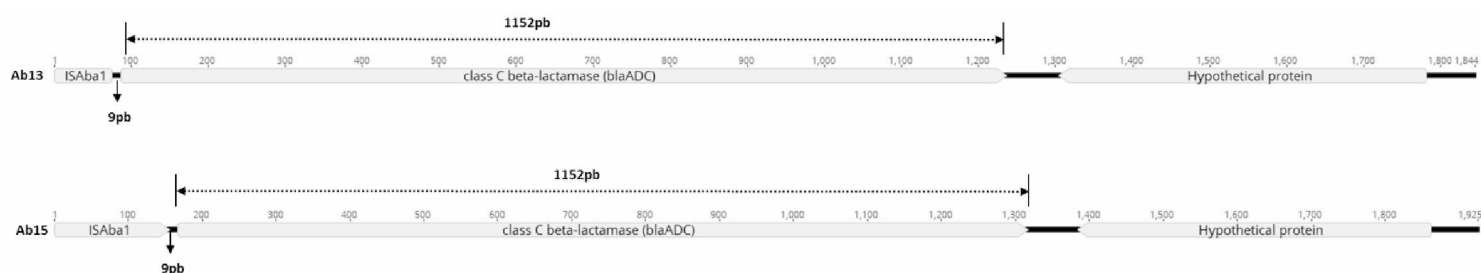


**Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme da amostra ambiental/superfície de *Acinetobacter baumannii*, Ab15, desenvolvido na superfície de esfera de vidro após 24 horas de incubação. A) Controle negativo; B), C) e D) Formação de biofilme e crescimento bacteriano da amostra Ab15.

O genoma total pertencente às cepas Ab13 e Ab15 tinha um tamanho de 3,76 Mb e 3,69 Mb, e geraram um total de 7.694.708 e 9.944.440 *reads*, respectivamente, produzindo aproximadamente uma cobertura de sequência de 290X e 370X. A análise do sequenciamento do genoma completo confirmou que a amostra Ab13 (aspirado traqueal, clone A) pertence ao ST/CC231 e a amostra Ab15 (ambiental, clone H) pertence ao ST405/ CC109. A resistência aos carbapenêmicos é explicada pela presença do transposon Tn2008 (*ISAbal*-*bla*<sub>OXA-23</sub>), de localização plasmidial (Figura 8). Ambas as amostras possuem o gene *bla*<sub>OXA-69</sub>, variante do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, codificado intrinsecamente, e a resistência às cefalosporinas de terceira geração ocorre pelo aumento da transcrição do gene *ampC* (*bla*<sub>ADC-25</sub>) quando ligado à *ISAbal* (Figura 9).



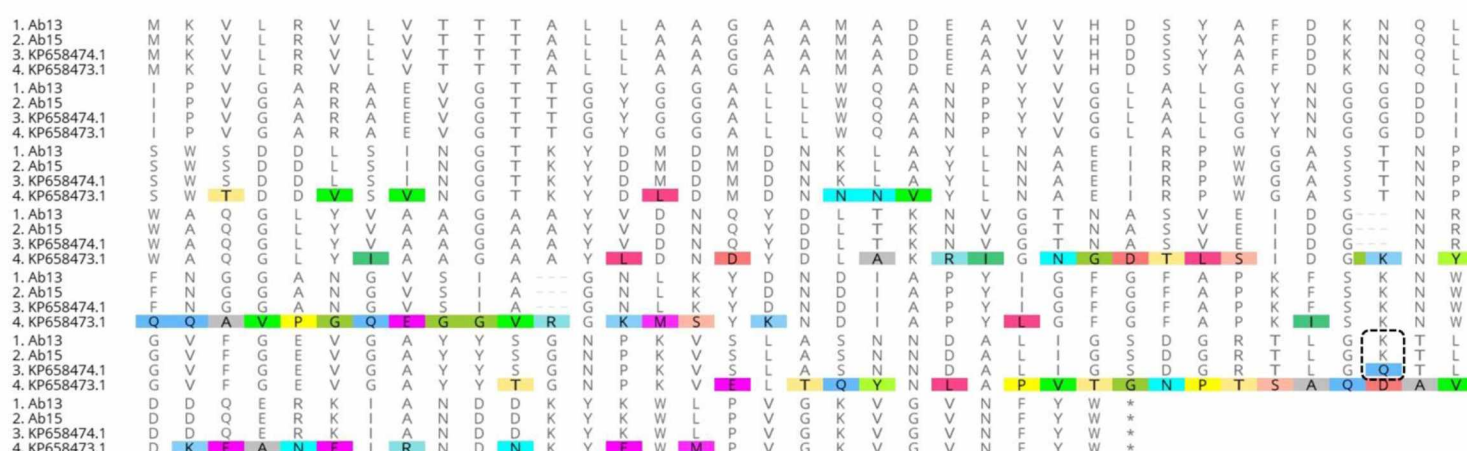
**Figura 8.** Representação esquemática do Tn2008, localização da *ISAbal* em região adjacente ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub> nas amostras analisadas.



**Figura 9.** Representação esquemática da localização *ISAbal* em região adjacente ao gene *bla*<sub>ADC-25</sub>.

Na amostra Ab13, a resistência aos aminoglicosídeos se justifica pela presença de uma enzima modificadora dessa droga (*aacA4*). Na amostra Ab15, os genes associados à resistência aos aminoglicosídeos são *aacA4*; *strA*; *strB*, e para cloranfenicol e sulfonamidas, *floR* e *sul2*, respectivamente. Em ambas as amostras identificou-se o gene de resistência às quinolonas mediado por plasmídeo (PMQR), *aac(6')Ib-cr*.

O sequenciamento do gene *carO* revelou que as duas amostras analisadas mostraram uma isoforma proteica diferente daquelas já cadastradas no banco de dados do NCBI (CarOa e CarOb), mas com semelhança de 99% com a cepa SJ22 cadastrada por Sen & Joshi (2015) (número de acesso no GenBank KP658474.1), diferindo apenas em uma alteração na posição 218 (substituição de glutamina para lisina; Q218K) (Figura 10). As amostras demonstraram 93% de identidade quando comparados à cepa de referência ATCC 19606 (CarOa; número de acesso no GenBank KP658473), suscetível aos carbapenêmicos, devido à presença de mutações pontuais. Também, não houve interrupção gênica pela inserção de *ISAbal*, portanto não ocorrendo inativação proteica.



**Figura 10.** Alinhamento da sequência do gene *carO* das duas amostras representativas de *Acinetobacter baumannii* deste estudo (Ab13 e Ab15) com as amostras SJ22 (GenBank: KP658474.1) e ATCC 19606 (GenBank: KP658473.1), indicando a homologia e a diferença de aminoácidos. O alinhamento foi construído utilizando *ClustalW Alignment*. O contorno pontilhado indica a região de mutação pontual (Q218K).

## 5- DISCUSSÃO

A emergência de infecções associadas a novos genótipos de *A. baumannii* resistente às drogas antimicrobianas reflete um desafio de grandes proporções considerando a disseminação global de diferentes variantes endêmicas e epidêmicas, que aumentam a morbidade, mortalidade e custos associados às infecções causadas por esse micro-organismo, representando ameaça considerável para a saúde pública (DIKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; PEREZ et al., 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GORDON; WAREHAM, 2010; MARAKI et al., 2016). Existe grande preocupação dos gestores hospitalares quanto ao aumento na frequência de amostras de *A. baumannii* multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR), o que dificulta

consideravelmente o tratamento das infecções (MEDEIROS; LINCOPAN, 2013; EL-SHAZLY et al., 2015; KAYE; POGUE, 2015; LEE et al., 2017; TUAN ANH et al., 2017).

Atualmente, estima-se que 40% dos pacientes hospitalizados recebem tratamento com algum tipo de antimicrobiano e em, aproximadamente 50% dos casos, este uso é desnecessário (WANNMACHER et al., 2004; MANDELL et al., 2005). Verificamos na nossa investigação que o consumo de carbapenêmicos foi alto, particularmente no ano de 2012, podendo refletir a alta frequência de amostras de *A. baumannii* contendo o gene *bla<sub>OXA-23</sub>*, na UTI Adulto do HC-UFU. Além dos carbapenêmicos, a elevação no consumo de colistina foi maior do que o relatado em outros hospitais, sobretudo naqueles de países europeus (DUMARTIN et al., 2010; GIANI et al., 2015). A terapia empírica com antibióticos é frequente, principalmente nas UTIs, exercendo pressão seletiva e ecológica no ambiente, havendo necessidade de medidas específicas para seu melhor controle, particularmente em hospitais brasileiros (VITRAT et al., 2014; KARAM et al., 2016).

A resistência aos antibióticos em *A. baumannii* atingiu níveis alarmantes no mundo todo, particularmente aos carbapenêmicos, e as amostras têm-se mostrado suscetíveis apenas às polimixinas (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013; JONES et al., 2014; COSTELLO et al., 2016; JASEMI et al., 2016; GAO; LYU; LI, 2017). No Brasil, infelizmente, as taxas de resistência aos carbapenêmicos são muito altas (80,7%) (ANVISA, 2014) e segundo estudo realizado por Gales e colaboradores (2012) houve aumento significativo nas frequências de resistência ao imipenem de 12,6% no período de 1997-1998 para 71,4% em 2008-2010, aumento também relatado por Rossi e colaboradores (2017), que indicaram variação de 30 para 70% na resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp., entre os anos de 2010 e 2014, em hospital de referência em São Paulo.

O aumento na resistência aos carbapenêmicos está associado principalmente à disseminação de amostras produtoras de OXA-23 (DALLA-COSTA et al., 2003; CARVALHO et al., 2009; MARTINS et al., 2009; MOSTACHIO et al., 2009; HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010; CHAGAS et al., 2014; ROYER et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015), o que pode ser explicado pela característica desse gene, que pode alocar-se também em plasmídeos, justificando em parte a sua abrangência em nível mundial (BROWN; AMYES, 2006; LABARCA et al., 2014; KAMOLVIT; SIDJABAT; PATERSON, 2015; NIGRO; HALL, 2016).

No nosso estudo, todas as amostras resistentes aos carbapenêmicos apresentaram o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* (ROYER et al., 2015). Além disso, a presença de elementos de inserção específicos, tais como *IS<sub>Aba1</sub>*, localizado adjacente aos genes *bla<sub>OXA</sub>*, leva a um aumento da regulação da sua expressão, resultando em diminuição adicional da suscetibilidade aos carbapenêmicos (POIREL;

NORDMANN, 2006; TURTON et al., 2006; RUIZ et al., 2007; ZONG et al., 2008; TUAN ANH et al., 2017). Outro aspecto importante da inserção dessas sequências é a possibilidade de facilitar a transferência de genes de resistência entre as amostras (VIANA et al., 2016).

Esse estudo detectou a presença do gene da sequência de inserção *ISAbal* e sua associação com os genes *bla<sub>OXA-51</sub>* e *bla<sub>OXA-23</sub>*, através da técnica de PCR. Aproximadamente metade das amostras analisadas apresentaram a associação *ISAbal/OXA-23*, relacionadas com elevada CIM para carbapenêmicos, o que também é observado no estudo de Viana e colaboradores (2016), que demonstrou o aumento da presença dessa associação entre os anos de 2009 e 2013, de 22 para 73%, correlacionado com aumento no nível de CIM para carbapenêmicos e variabilidade clonal. A presença da sequência de inserção *ISAbal* em altas frequências em *A. baumannii* evidencia que essa sequência está amplamente difundida nessa espécie (VILLALÓN et al., 2013; PAGANO et al., 2016). Em algumas das amostras testadas não houve a detecção do gene *ISAbal* ou a associação *ISAbal/OXA-51* ou *ISAbal/OXA-23*, apesar de apresentarem CIMs elevados. Isso pode estar relacionado à coexistência de outros mecanismos de resistência que poderiam justificar esse resultado.

Duas amostras clínicas, apesar de suscetíveis aos carbapenêmicos, apresentaram a associação *ISAbal/OXA-51*. Essa combinação deveria conferir resistência aos carbapenêmicos, conforme proposto por Turton e colaboradores (2006). Contudo, assim como no trabalho de Pagano e colaboradores (2013), nossos dados sugerem que a promoção do gene *bla<sub>OXA-51</sub>* sem uma transcrição eficiente desse gene não seria capaz de conferir resistência aos carbapenêmicos.

Vale ressaltar que além das oxacilinas há também as metalo- $\beta$ -lactamases (MBL), que são menos frequentes em *A. baumannii* (DA SILVA; DOMINGUES, 2016), mas mais potentes. No presente estudo, não foram detectadas amostras com genes para MBLs. Porém, verificou-se a presença simultânea dos genes que expressam resistência a carbapenêmicos e a sequência de inserção *ISAbal*.

Os nossos resultados sugerem que a combinação *ISAbal/OXA-23* pode ser um dos mecanismos de resistência mais significativos em *A. baumannii* em função da alta frequência do gene e do fenótipo XDR, associados à CIMs elevadas para os carbapenêmicos (valores de CIM pelo Etest<sup>®</sup> para imipenem e meropenem  $>32\mu\text{g/mL}$ ). Outro aspecto preocupante observado foi a elevada resistência das amostras à tigeciclina (CIMs  $\geq 8\mu\text{g/mL}$ ) após realização do Etest<sup>®</sup>, o que foi confirmado também em estudos prévios como o de Costello e colaboradores (2016), que relataram tendência crescente na resistência a esse antimicrobiano nos anos de 2010 e 2011 (4,2% para 10,5%)

em hospitais da América Latina. No Brasil, há poucos dados sobre a resistência à tigeciclina em amostras hospitalares de *A. baumannii*. O trabalho de Pereira (2013) evidenciou frequência de resistência à tigeciclina de 5,3%, com resultados obtidos através do sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2, valores bem inferiores aos observados na nossa investigação.

Além disso, nesse trabalho, foram constatadas diferenças nos resultados dos testes de suscetibilidade aos carbapenêmicos e tigeciclina obtidos através do sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 e da técnica de Etest<sup>®</sup>, com maior sensibilidade quando da detecção de resistência pela última técnica. Métodos automatizados são amplamente utilizados na prática clínica devido a sua eficiência, entretanto, de acordo com a literatura, a acurácia desses métodos na avaliação da suscetibilidade aos carbapenêmicos e à tigeciclina tem sido discordantes (MARKELZ et al., 2011). Os nossos resultados mostraram uma elevada concordância entre os testes quanto à resistência aos carbapenêmicos, enquanto em relação à tigeciclina, observou-se que dez amostras comportaram-se como suscetíveis pelo VITEK 2<sup>®</sup> e resistentes pelo Etest<sup>®</sup>.

De acordo com a literatura, ambas as metodologias (VITEK 2<sup>®</sup> e Etest<sup>®</sup>) apresentam divergências quando comparadas com o teste considerado referência que é a microdiluição em caldo (MD). Enquanto o método automatizado tende a subestimar os valores, o Etest<sup>®</sup> tende a superestimá-los (GRANDESSO et al., 2014; MARCHAIM et al., 2014). Em função dessas discordâncias, Zarkotou e colaboradores (2012) recomendam que os resultados liberados pelo VITEK 2<sup>®</sup> sejam confirmados por MD ou Etest<sup>®</sup>. De acordo com Zavaski e colaboradores (2010), quando a CIM por Etest<sup>®</sup> for  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ , um teste confirmatório, como a MD, precisa ser realizado. No nosso estudo todas as amostras foram avaliadas pela técnica de MD e apresentaram alto nível de resistência à tigeciclina, o que compromete sua utilização em monoterapia. A tigeciclina tem sido utilizada para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR (SCHAFER et al., 2007; KARAGEORGOPOULOS et al., 2008; STEIN; BABINCHAK, 2012), no entanto, o FDA limita seu uso às seguintes situações: infecções de pele complicadas, infecções intra-abdominais complicadas e pneumonia adquirida na comunidade (FDA, 2013).

Um importante aspecto a ser destacado neste trabalho, e que pode explicar os elevados valores das CIMs para tigeciclina, tanto na metodologia de Etest<sup>®</sup> quanto na MD, foi o grande número de amostras que apresentaram subpopulações resistentes dentro da zona de inibição formada pelo antimicrobiano. A heterorresistência é definida como a presença de subpopulações bacterianas com os níveis mais elevados de resistência aos antibióticos do que o resto da população na mesma cultura (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). A espécie na qual a heterorresistência tem

sido reportada frequentemente e para a qual os mecanismos são mais bem entendidos é o *S. aureus*, poucos trabalhos tratam desse fenômeno em outros micro-organismos (RINDER, 2001; EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). Para *A. baumannii*, a heterorresistência aos carbapenêmicos e à colistina tem sido investigada (POURNARAS et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2009). No caso da tigeciclina, isso é particularmente importante, já que seu uso em monoterapia, desconsiderando a existência de subpopulações heterorresistentes, conduzirá à erradicação dos membros mais sensíveis e selecionará aqueles resistentes (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). No entanto, em nosso hospital, a maioria dos pacientes críticos são tratados com mais de um agente antimicrobiano, havendo, portanto, menor probabilidade dessa seleção.

Apesar da carbapenemase OXA-23 ser considerada o principal mecanismo responsável pela resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (KEMPF; ROLAIN, 2012; OPAZO et al., 2012), esse fenótipo também pode resultar da modificação na estrutura primária ou perda das proteínas de membrana externa (PME) (porinas), como a proteína de 33-36 kDa e a proteína de 29 kDa chamada de CarO (NOVOVIC et al., 2015). No caso da PME CarO, na maioria das vezes, as modificações são resultado da ruptura do gene por vários elementos de inserção (CATEL-FERREIRA et al., 2011).

Nossos dados evidenciaram que a grande maioria das amostras apresentaram os genes para ambas as porinas (82,6%, CarO; 100%, 33-36 kDa) e, em relação à quantificação da expressão do gene *carO*, pode-se observar que a maior frequência das amostras apresentou nível basal de transcrição, assim como a amostra referência, ou um baixo nível de transcrição, ou seja, a porina não estava ausente ou com sua função comprometida. Podemos inferir então que a proteína CarO não é responsável pela resistência aos carbapenêmicos nas amostras avaliadas neste estudo, o mesmo observado no trabalho de Fonseca e colaboradores (2013), em amostras de *A. baumannii* que produzem OXA-23 no Brasil. Estudos recentes têm associado as Omp33-36 e CarO à virulência nesse micro-organismo (FERNÁNDEZ-CUENCA et al., 2011; RUMBO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016; LEE et al., 2017).

A análise do sequenciamento do gene *carO* revelou uma isoforma proteica diferente daquelas já cadastradas no banco de dados do NCBI (CarOa e CarOb). Observou-se uma mutação pontual na proteína (Q218K), não relatada até o momento, não sendo possível, dessa forma, determinar a sua participação exata na resistência ao imipenem. Alguns estudos evidenciam que alterações nessa proteína podem diminuir a afinidade ao imipenem, contribuindo para o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos (VASHIST et al., 2010; FONSECA et al., 2013).

Conforme mencionado anteriormente, outro mecanismo de resistência aos antimicrobianos presente nesse micro-organismo é a hiperexpressão de bombas de efluxo, como aquelas pertencentes à família RND (AdeABC, AdeFGH e AdeIJK) (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007). A hiperexpressão principalmente das bombas AdeABC e AdeFGH, desempenham um papel importante na resistência adquirida (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011; YOON; COURVALIN; GRILLOT-COURVALIN, 2013), enquanto a AdeIJK contribui na resistência intrínseca (DAMIER-PIOLLE et al., 2008). Baseado nos resultados do qPCR, observou-se que apenas o gene *adeB* foi hiperexpresso. Segundo a literatura (YOON et al., 2015), amostras que contém a bomba AdeABC, conferem resistência à vários antibióticos, incluindo a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina, macrolídeos, lincosamidas e cloranfenicol. Ruzin e colaboradores (2007) confirmaram o papel da bomba AdeABC na redução da suscetibilidade à tigeciclina pela inativação do gene *adeB*, o que levou a uma redução significativa nos CIMs de 4 para 0,5ug/ml. Assim, juntamente com a presença da OXA-23, esta bomba é outro mecanismo importante presente nas amostras analisadas nessa investigação. Entre as 10 amostras de *A. baumannii* testadas, a maioria delas produziu AdeG e AdeJ em nível inferior ou equivalente ao da ATCC 19606, resultados semelhantes os relatados por Pagdepanichkit e colaboradores (2016).

Além dos genes responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos, ou seja os genes para oxacilinasas, porinas e bombas de efluxo, identificamos na população estudada oito STs, agrupados em cinco complexos clonais diferentes (113, 109, 229, 235 e 231) associados com amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii* MDR. Os STs 1399 e 1489, pertencentes ao CC229, são considerados *single-locus variant* (SLVs), diferindo apenas no alelo *gpi*, assim como os STs 233, 258 e 227, pertencentes ao CC113. A maioria das amostras analisadas (n=4) pertenceram ao CC113, que está disseminado na América Latina e no Brasil (CLÍMACO et al., 2013; COELHO-SOUZA et al., 2013; MARTINS et al., 2013; STIETZ et al., 2013; MARTINS et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2015; LEITE et al., 2016). Adicionalmente, foi determinado um novo ST, ST1399, pertencente ao CC229, e um outro (ST258), já caracterizado previamente, pertencente ao CC113, que não possuem “parentesco” com nenhum ST anteriormente descrito.

Atualmente, o CC92, associado ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, é considerado o complexo clonal mais disseminado do banco de dados do MLST de *A. baumannii* (KARAH et al., 2012; ZARRILLI et al., 2013). Como as amostras produtoras de OXA-23 analisadas neste estudo não estavam relacionadas a esse CC específico, sugere-se que a disseminação desses genes no Brasil deva estar associada à

mobilização mediada por plasmídeos, similares àqueles encontrados em amostras pertencentes ao CC92 (MUGNIER et al., 2010). Entretanto, os mecanismos que favorecem a aquisição e a disseminação de um tipo particular de oxacilinase não estão claros (MAYANSKIY et al., 2017).

No Brasil, merece destaque outro CC identificado em amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, o CC109, correspondente ao clone internacional 1 (MARTINS et al., 2012; CLÍMACO et al., 2013; MARTINS et al., 2015). No nosso estudo foi detectado o ST405, associado a este CC, em duas amostras, sendo uma de origem clínica (Ab05) e outra ambiental (Ab15), com perfis de PFGE distintos, correspondentes aos clones D e H, respectivamente. O contrário foi observado para amostra Ab18 (clínica) e Ab21 (ambiental) que apresentaram o mesmo perfil clonal G, entretanto expressaram STs distintos ligados ao CC113.

Os resultados do PFGE mostraram pouca correlação com os resultados do MLST, pois em alguns casos o mesmo ST foi observado em perfis de PFGE diferentes e dentro do mesmo perfil, STs diferentes. Assim, não é possível afirmar que dentro de um mesmo perfil de *pulsed field* há um único ST. Isso poderia ser parcialmente justificado pelas diferenças metodológicas das duas técnicas, ou seja, o PFGE avalia todo o DNA bacteriano enquanto o MLST apenas 7 genes *housekeeping*. Os nossos dados evidenciaram uma diversidade de perfis entre as amostras, independente da técnica de discriminação molecular utilizada (PFGE ou MLST).

Em síntese, a importância do MLST nesse estudo foi clara pois permitiu a comparação dos nossos resultados com o cenário nacional e mundial quanto à distribuição, predominância e mudança nos STs circulantes em amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*. Isto pode ser evidenciado com a descrição de um novo ST, bem como STs em comum circulando no ambiente hospitalar.

O interesse por *A. baumannii* aumentou rapidamente devido a capacidade que esses agentes possuem de resistir aos desinfetantes, permitindo sua sobrevivência por longo período de tempo em superfícies abióticas e secas, além de sua habilidade em formar biofilme (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; ESPINAL; MARTI; VILA, 2012; LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; DUARTE et al., 2016). Isso sugere que a formação de biofilme pode representar um papel relevante na disseminação de amostras de *A. baumannii* no ambiente hospitalar bem como para o sucesso de bactérias patogênicas causarem infecção (VUOTTO et al., 2014). Assim, a presença de fatores de resistência e virulência e a capacidade de formar biofilme podem contribuir para a emergência e a disseminação de fenótipos altamente adaptativos no ambiente hospitalar, como foi evidenciado nesse estudo (LEE et al., 2008; ESPINAL; MARTI; VILA, 2012; SANCHEZ et al., 2013).

Embora a literatura descreva diferentes modelos epidemiológicos para o estudo de biofilmes bacterianos, pouca atenção tem sido dada ao papel significativo da formação de biofilme por esses patógenos. Nosso trabalho demonstrou variação na formação de biofilme em 10 amostras já caracterizadas quanto ao perfil clonal e genes de resistência. Esse trabalho, a exemplo do relatado por Duarte e colaboradores (2016), mostra que não houve relação entre a variabilidade clonal e a produção de biofilme, apesar de outros estudos indicarem que esta relação está presente (SANCHEZ et al., 2013).

Está amplamente estabelecido, assim como observado na nossa investigação, que a formação de biofilme é prevalente entre amostras clínicas associadas com diferentes síndromes infecciosas (DONLAN, 2001; SANCHEZ et al., 2013; HOIBY et al., 2015). Amostras recuperadas de tecidos, ossos e do trato respiratório tem maior capacidade de formação de biofilme, determinado por experimentos com cristal violeta, em comparação com amostras recuperadas de sangue e urina, por exemplo (SANCHEZ et al., 2013). Em trabalho realizado por nossa equipe, publicado em 2016 por Batistão e colaboradores, foi relatada forte produção de biofilme em amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* recuperados do sítio cirúrgico, o que foi observado em menor frequência naquelas associadas a outras infecções. Embora essas relações não tenham sido avaliadas no presente estudo, uma vez que as amostras analisadas foram recuperadas de aspirado traqueal e de ambiente, todas elas foram capazes de produzir biofilme.

As amostras com esse fenótipo são resistentes a um maior número de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, carbapenêmicos e cefalosporinas (LEE et al., 2008; SANCHEZ et al., 2013). Em nosso estudo não foi possível relacionar a produção de biofilme com a maior resistência as antibióticos em função do pequeno número de amostras analisadas, entretanto, observou-se que aquelas suscetíveis aos carbapenêmicos comportaram-se como produtoras fracas de biofilme. A maioria das amostras foram classificadas como XDR e, duas delas, de um mesmo clone, uma de origem clínica e outra ambiental, mostraram diferentes capacidades de formação de biofilme. Entretanto, não houve diferença significativa no ensaio em placas de 96 poços nos dois grupos (amostras clínicas e ambientais), como observado no trabalho de Obeidat e colaboradores (2014). Além disso, em geral, quando se trata de amostras clínicas, estudos anteriores demonstraram que a formação de biofilme é maior em amostras MDR (LEE et al., 2008; SANCHEZ et al., 2013; NAPARSTEK et al., 2014). Em relação a esse aspecto, semelhante ao estudo de Batistão e colaboradores (2016) e Bocanegra-Ibarras e colaboradores (2015), nenhuma relação entre a

formação de biofilme e a multirresistência foi encontrada nas amostras clínicas avaliadas nesta investigação.

Outro aspecto importante é a adesão inicial do micro-organismo nas superfícies, passo considerado essencial para a formação do biofilme. Infelizmente, a maioria dos estudos publicados avaliam essa produção apenas por experimentos de cristal violeta e/ou ágar vermelho Congo (LEE et al., 2008; ESPINAL; MARTI; VILA, 2012; SANCHEZ et al., 2013; IYAMBA et al., 2016; PEDROSO et al., 2016), sem mensurar a concentração ou adesão de células do biofilme. Para tanto, o nosso estudo é dos poucos no país a utilizar uma metodologia laboriosa que permite avaliar estatisticamente a adesão bacteriana, a quantidade de células no biofilme e a biomassa do biofilme, e é o único que mostra essa relação em amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*.

Como não foi encontrada diferença na produção de biofilme em amostras de superfície e clínicas por testes fenotípicos, realizou-se a MEV a partir de cultura em esferas de vidro de ambas amostras, para confirmar a hipótese de que aquelas ambientais tem melhor habilidade na produção de biofilme, com a presença mais abundante de matriz extracelular. Isso foi confirmado no nosso estudo. Entretanto, amostras com perfis clonais diferentes, resistentes e/ou suscetíveis aos carbapenêmicos, apresentaram taxas similares de crescimento no biofilme. Este achado pode sugerir que a capacidade de formação de biofilme tem um significado limitado na disseminação clonal de cepas clínicas e ambientais de *A. baumannii*.

A formação de biofilme é um componente importante na virulência de vários micro-organismos associados às infecções hospitalares. Em nosso estudo, todas as amostras analisadas foram produtoras de biofilme em maior ou menor grau, independente do clone circulante. Em síntese, a dificuldade de erradicar essas bactérias do ambiente, aliada à resistência antimicrobiana e a outros fatores de virulência não avaliados nesse trabalho, contribuem para sua sobrevivência no ambiente hospitalar e para sua importância como agente de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Reforçando essa observação, o sequenciamento do genoma completo fornece a base para uma análise genômica detalhada, que certamente aumenta nossa compreensão sobre o papel de *A. baumannii* no hospedeiro e no ambiente. A partir dos resultados obtidos para as amostras Ab13 e Ab15, pode-se comprovar que a resistência aos carbapenêmicos se deve principalmente à presença do Tn2008, facilmente propagado entre as amostras, inclusive de clones diferentes como comprovado em nosso estudo, e também disseminado no mundo todo (WANG; ZONG; LÜ, 2011; CHEN et al., 2017). Também, a resistência intrínseca às cefalosporinas de terceira geração é devido

ao aumento da transcrição do gene *bla*<sub>ADC-25</sub>, devido a presença da *ISAbal* adjacente ao gene, atuando como um forte promotor, conforme já descrito na literatura (HAMIDIAN et al., 2013; KARAH et al., 2016; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Outro mecanismo também detectado foi a presença de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como *aacA4* (KARAH et al., 2016; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Além disso, identificou-se o gene de resistência às quinolonas mediado por plasmídeo (PMQR), *aac(6')Ib-cr*, dado relevante uma vez que este gene é bem descrito em membros da família *Enterobacteriaceae* e em *P. aeruginosa* (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; JIANG et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016), mas pouco estudado em *A. baumannii* (LEE et al, 2016).

## 6- CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho mostram a disseminação de diferentes STs de *A. baumannii* XDR produtores de biofilme, contendo a associação frequente de *ISAbal/OXA-23*, independentemente de sua origem clínica ou ambiental. Adicionalmente, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Houve alta densidade do uso dos antibióticos: carbapenêmicos, tigeciclina e polimixina B/colistina, particularmente no ano de 2012;
- Alta frequência da associação *ISAbal/OXA-23* relacionada com CIM elevada aos carbapenêmicos nas amostras analisadas;
- A resistência aos carbapenêmicos é devida à presença do Tn2008 e hiperprodução da bomba AdeABC;
- A resistência às cefalosporinas pode ser explicada pela presença de *ISAbal* como forte promotor do gene *bla*<sub>ADC-25</sub>;
- A substituição de uma glutamina por uma lisina na posição 218 (Q218K) da proteína CarO pode estar associada com a diminuição da afinidade ao imipenem;
- A maioria das amostras pertenceram ao CC113, amplamente disseminado na América Latina e no Brasil. Adicionalmente, foi determinado um novo ST, ST1399;
- Os resultados confirmam a capacidade de formação de biofilme em amostras clínicas de *A. baumannii* bem como em amostras ambientais.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS-HADUCH, J.M.; ONUOHA, E.O.; BOGDANOVICH, T.; TIAN, G.B.; MARSCHALL, J.; URBAN, C.M.; SPELLBERG, B.J.; RHEE, D.; HALSTEAD, D.C.; PASCULLE, A.W.; DOI, Y. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.11, p. 3849-54, 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.215, n.3, p.403-10, 1990.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim Informativo - **Segurança do Paciente e Qualidade dos Serviços de Saúde**. Ano V, n. 9, dezembro de 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>.
- ARAUJO, B.F.; FERREIRA, M.L.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.; DANTAS, R.C.; GONÇALVES, I.R.; FARIA, A.L.; BRITO, C.S.; YOKOSAWA, J.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1* and *bla<sub>SPM</sub>* Genes in Brazil. **PloS one**, v.11, n.5, p.e0155914, 2016.
- ATS. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.171, p. 388–416, 2005.
- AZEVEDO, F. M. Micro-organismos multirresistentes. In: OLIVEIRA, A. C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- BARTUAL, S.G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M.A.; WISPLINGHOFF, H.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4382-90, 2005.
- BATISTÃO, D.W.; CAMPOS, P.A.; CAMILO, N.C.; ROYER, S.; ARAUJO, B.F.; NAVES, K.S.; MARTINS, M.; PEREIRA, M.O.; HENRIQUES, M.; GONTIJO-FILHO, P.P.; BOTELHO, C.; OLIVEIRA, R.; RIBAS, R.M. Biofilm formation of Brazilian meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p.286-297, 2016.
- BISWAS, S.; BRUNEL, J.M.; DUBUS, J.C.; REYNAUD-GAUBERT, M. ROLAIN, Colistin: an update on the antibiotic of the 21<sup>st</sup> century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 917-934, 2012.
- BOCANEGRA-IBARIAS, P.; PEÑA-LÓPEZ, C.; CAMACHO-ORTIZ, A.; LLACA-DÍAZ, J.; SILVA-SÁNCHEZ, J.; BARRIOS, H.; GARZA-RAMOS, U.; RODRÍGUEZ-FLORES, A.M.; GARZA-GONZÁLEZ, E. Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.45, p.309-313, 2015.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n.1, p.1-3, 2006.

CAMP, C.; TATUM, O.L. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. **LabMedicine**, v.41, n.11, p. 649-657, 2010.

CARDOSO, J.P.; CAYÔ, R.; GIRARDELLO, R.; GALES, A.C. Diversity of mechanisms conferring resistance to  $\beta$ -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.85, n.1, p.90-7, 2016.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, n.1, p.25-8, 2009.

CATEL-FERREIRA, M.; COADOU, G.; MOLLE, V.; MUGNIER, P.; NORDMANN, P.; SIROY, A.; JOUENNE, T.; DÉ, E. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.9, p. 2053-6, 2011.

CERDEIRA, L.T.; CARNEIRO, A.R.; RAMOS, R.T.; DE ALMEIDA, S.S.; D'AFONSECA, V.; SCHNEIDER, M.P.; BAUMBACH, J.; TAUCH, A.; MCCULLOCH, J.A.; AZEVEDO, V.A.; SILVA, A. Rapid hybrid de novo assembly of a microbial genome using only short reads: *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19 as a case study. **Journal of microbiological methods**, v.86, n.2, p.218-23, 2011.

CHAGAS, T.P.; CARVALHO, K.R.; DE OLIVEIRA SANTOS, I.C.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; ASENSI, M.D. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.79, n.4, p.468-72, 2014.

CHASTRE, J.; FAGON, J.Y. Ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**, v.165, n.7, p.867-903, 2002.

CHEN, Y., GAO, J., ZHANG, H., YING, C. Spread of the *bla*OXA-23-Containing Tn2008 in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Grouped in CC92 from China. **Frontiers in microbiology**, v.8, 2017.

CLÍMACO, E.C.; OLIVEIRA, M.L.; PITONDO-SILVA, A.; OLIVEIRA, M.G.; MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N.; DA COSTA DARINI, A.L. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p.127-33, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25, v.35, n.3, 2015.

- COELHO-SOUZA, T.; REIS, J.N.; MARTINS, N.; MARTINS, I.S.; MENEZES, A.O.; REIS, M.G.; SILVA, N.O.; DIAS, R.C.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.5, p. E241-4, 2013.
- COSTELLO, S.E.; GALES, A.C.; MORFIN-OTERO, R.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. Mechanisms of Resistance, Clonal Expansion, and Increasing Prevalence of *Acinetobacter baumannii* Strains Displaying Elevated Tigecycline MIC Values in Latin America. **Microbial Drug Resistance**, v.22, n.4, p. 253-8, 2016.
- COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.55, n.3, p.947-53, 2011.
- COYNE, S.; ROSENFELD, N.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.54, n.10, p.4389-93, 2010.
- DA SILVA, G.J.; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**, v.4, n.3, pii: E29, 2016.
- DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.; CASTRO, M.E.; STIER, C.J.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3403-6, 2003.
- DAMIER-PIOLLE, L.; MAGNET, S.; BRÉMONT, S.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.52, n.2, p.557-62, 2008.
- DANTAS, R.C.; FERREIRA, M.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, n.12, p.1679-1687, 2014.
- DANTAS, R.C.C.; SILVA, R.T.E.; FERREIRA, M.L.; GONÇALVES, I.R.; ARAÚJO, B.F.; CAMPOS, P.A.; ROYER, S.; BATISTÃO, D.W.D.F.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PLoS One**, v.12, n.5, p.e0176774, 2017.
- DIANCOURT, L.; PASSET, V.; NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; BRISSE, S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. **PLoS One**, v.5, n.4, p.e10034, 2010.
- DIJKSHOORN, L.; AUCKEN, H.; GERNER-SMIDT, P.; JANSSEN, P.; KAUFMANN, M.E.; GARAIZAR, J.; URSING, J.; PITT, T.L. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, n.6, p. 1519-25, 1996.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.12, p.939-51, 2007.

DOI, Y.; MURRAY, G.L.; PELEG, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.36, n.1, p. 85–98, 2015.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.277-81, 2001.

DUARTE, A.; FERREIRA, S.; ALMEIDA, S.; DOMINGUES, F.C. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.45, p. 29-33, 2016.

DUMARTIN, C.; L'HÉRITEAU, F.; PÉFAU, M.; BERTRAND, X.; JARNO, P.; BOUSSAT, S.; ANGORA, P.; LACAVÉ, L.; SABY, K.; SAVEY, A.; NGUYEN, F.; CARBONNE, A.; ROGUES, A.M. Antibiotic use in 530 French hospitals: results from a surveillance network at hospital and ward levels in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.2028-2036, 2010.

DYAR, O.J.; PAGANI, L.; PULCINI, C. Strategies and challenges of antimicrobial stewardship in long-term care facilities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, n.1, p.10-19, 2015.

EIJKELKAMP, B.A.; STROEHER, U.H.; HASSAN, K.A.; PAPADIMITRIOUS, M.S.; PAULSEN, I.T.; BROWN, M.H. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.323, n.1, p. 44-51, 2011.

EL-HALFAWY, O.M.; VALVANO, M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.1, p. 191-207, 2015.

EL-SHAZLY, S.; DASHTI, A.; VALI, L.; BOLARIS, M.; IBRAHIM, A.S. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.41, p.42-9, 2015.

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

FALAGAS, M.E.; MICHALOPOULOS, A. Polymyxins: old antibiotics are back. **The Lancet**, v. 367, n. 9511, p. 633-634, 2006.

FDA, Food and Drug Administration, 2013. Tygacil package insert, Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA). Acesso em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/021821s026s031lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021821s026s031lbl.pdf)>. Acesso em: janeiro de 2014.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CONEJO, M.C.; AYALA, J.A.; PEREA, E.J.; PASCUAL, A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.3, p.565-74, 2003.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; SMANI, Y.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.C.; DOCOBO-PÉREZ, F.; CABALLERO-MOYANO, F.J.; DOMÍNGUEZ-HERRERA, J.; PASCUAL, A.; PACHÓN, J. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.6, p. 548-9, 2011.

FITZPATRICK, M.A.; OZER, E.A.; HAUSER, A.R. Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing *Acinetobacter* Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.3, p. 593-612, 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.9, p.623-33, 2010.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, n.9, p. 563-75, 2016.

FONSECA, E.L.; SCHEIDEGGER, E.; FREITAS, F.S.; CIPRIANO, R.; VICENTE, A.C. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and blaOXA-23 gene. **BMC Microbiology**, v.13, p.1-7, 2013.

GADDY, J.A.; ACTIS, L.A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiology**, v.4, n.3, p.273-8, 2009.

GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n.4, p.354-60, 2012.

GAO, L.; LYU, Y.; LI, Y. Trends in Drug Resistance of *Acinetobacter baumannii* over a 10-year Period: Nationwide Data from the China Surveillance of Antimicrobial Resistance Program. **Chinese Medical Journal**, v.130, n.6, p. 659-664, 2017.

GARNACHO-MONTERO, J.; CORCIA-PALOMO, Y.; AMAYA-VILLAR, R.; MARTIN-VILLEN, L. How to treat VAP due to MDR pathogens in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p.1-7, 2014.

GARNACHO-MONTERO, J.; ORTIZ-LEYBA, C.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F.J.; BARRERO-ALMODÓVAR, A.E.; GARCÍA-GARMENDIA, J.L.; BERNABEU-WITTELL, M.; GALLEGU-LARA, S.L.; MADRAZO-OSUNA, J. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.9, p. 1111-8, 2003.

GANI, T.; ARENA, F.; VAGGELLI, G.; CONTE, V.; CHIARELLI, A.; HENRICI DE ANGELIS, L.; FORNAINI, R.; GRAZZINI, M.; NICCOLINI, F.; PECILE, P.; ROSSOLINI, G.M. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, p.3341-3344, 2015.

GIRARD, L.P.; CERI, H.; GIBB, A.P.; OLSON, M.; SEPANDJ, F. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v.30, n.6, p.652-656, 2010.

GIRARDELLO, R.; VISCONDE, M.; CAYÔ, R.; FIGUEIREDO, R.C.; MORI, M.A.; LINCOPAN, N.; GALES, A.C. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.87, n.1, p. 37-44, 2017.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.54, n.1, p.578-9, 2010.

GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.3, p.219-226, 2010.

GRANDESSO, S.; SAPINO, B.; AMICI, G.; MAZZUCATO, S.; SOLINAS, M.; GION, M. Are E-test and Vitek2 good choices for tigecycline susceptibility testing when comparing broth microdilution for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii*? **The New Microbiologica**, v.37, n.4, p. 503-8, 2014.

GRGURICH, P.E.; HUDCOVA, J.; LEI, Y.; SARWAR, A.; CRAVEN, D.E. Management and prevention of ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v.6, n.5, p. 533-55, 2012.

GROSSO, F.; CARVALHO, K.R.; QUINTEIRA, S.; RAMOS, A.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; ASENSI, M.D.; PEIXE, L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.11, p.62-5, 2011.

GUPTA, R.; MALIK, A.; RIZVI, M.; AHMED, M.; SINGH, A. Epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from ventilator-associated pneumonia in ICU patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.9, p. 47-50, 2017.

GURUNG, J.; KHYRIEM, A.B.; BANIK, A.; LYNDOH, W.V.; CHOUDHURY, B.; BHATTACHARYYA, P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v.17, n.4, p. 214-8, 2013.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 3, p. 217-223, 2006.

HAMOUDA, A.; EVANS, B.A.; TOWNER, K.J.; AMYES, S.G. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of blaOXA-51-like genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.7, p.2476-83, 2010.

HARBARTH, S. Epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. **Archives of Surgery**, v. 137, n. 12, p. 1353-1359, 2002.

HE, H.; ZHENG, Y.; SUN, B.; TANG, X.; WANG, R.; TONG, Z. Tigecycline combination for ventilator-associated pneumonia caused by extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Journal of Thoracic Disease**, v.8, n.10, p. 2784-2792, 2016.

HENGZHUANG, W.; WU, H.; CIOFU, O.; SONG, Z.; HØIBY, N. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.9, p.4469-4474, 2011.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FOURNIER, P.E.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.49, n.10, p.4174-9, 2005.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.3, p.305, 2010.

HIGGINS, P.G.; PÉREZ-LLARENA, F.J.; ZANDER, E.; FERNÁNDEZ, A.; BOU, G.; SEIFERT, H. OXA-235, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.57, n.5, p. 2121-6, 2013.

HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.53, n.12, p.5035-8, 2009.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G.L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L.; HOLÁ, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MØLLER, K.; LEBEAUX, D.; OLIVER, A.; ULLMANN, A.J.; WILLIAMS, C.; ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, Suppl 1:S1-25, 2015.

HOLT, K.; KENYON, J.J.; HAMIDIAN, M.; SCHULTZ, M.B.; PICKARD, D.J.; DOUGAN, G.; HALL, R. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. **Microbial Genomics**, v.2, n.2, e000052, 2016.

HUANG, G.; YIN, S.; GONG, Y.; ZHAO, X.; ZOU, L.; JIANG, B.; DONG, Z.; CHEN, Y.; CHEN, J.; JIN, S.; YUAN, Z.; PENG, Y. Multilocus Sequence Typing Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Chinese Burns Institute. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 1717, 2016.

IYAMBA, J.L.; OKOMBE, D.T.; ZAKANDA, F.N.; MALONGO, T.K.; UNYA, J.W.; LUKUKULA, C.M.; KIKUNI, N.Z. Adherence of *Staphylococcus aureus* to catheter tubing inhibition by quaternary ammonium compounds. **The Pan African Medical Journal**, v.29, 2016.

JASEMI, S.; DOURAGHI, M.; ADIBHESAMI, H.; ZERAATI, H.; RAHBAR, M.; BOROUMAND, M.A.; ALIRAMEZANI, A.; GHOURCHIAN, S.; MOHAMMADZADEH, M. Trend of extensively drug-resistant

*Acinetobacter baumannii* and the remaining therapeutic options: a multicenter study in Tehran, Iran over a 3-year period. *Letters in Applied Microbiology*, v.63, n.6, p. 466-472, 2016.

JAWAD, A.; SEIFERT, H.; SNELLING, A.M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.7, p.1938-41, 1998.

JIANG, X.; YU, T.; JIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; MA, J. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Henan, China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v.79, n.3, p.381-383, 2014.

JIN, H.; XU, X.M.; MI, Z.H.; MOU, Y.; LIU, P. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chinese Medical Journal*, v.122, n.3, p.301-6, 2009.

JOHANSEN, H. K.; MOSKOWITZ, S. M.; CIOFU, O.; PRESSLER, T.; HOIBY, N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 7, n. 5, p. 391-397, 2008.

JONES, R.N.; FLONTA, M.; GURLER, N.; CEPPARULO, M.; MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.78, n.4, p. 429-36, 2014.

KAMOLVIT, W.; SIDJABAT.; H.E.; PATERSON, D.L. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microbial Drug Resistance*, v.21, n.4, p. 424-34, 2015.

KARAGEORGOPOULOS, D.E.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; FALAGAS, M.E. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.62, n.1, p.45-55, 2008.

KARAH, N.; DWIBEDI, C.K.; SJÖSTRÖM, K.; EDQUIST, P.; JOHANSSON, A.; WAI, S. N.; UHLIN, B.E. Novel aminoglycoside resistance transposons and transposon-derived circular forms detected in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.60, n.3, p.1801-1818, 2016.

KARAH, N.; SUNDSFJORD, A.; TOWNER, K.; SAMUELSEN, Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates*, v.15, n.4, p. 237-47, 2012.

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v.15, n.10, p. 1351-70, 2014.

KARAM, G.; CHASTRE, J.; WILCOX, M.H.; VINCENT, J.L. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, v.20, n.1, p.136, 2016.

- KAYE, K.S.; POGUE, J.M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**, v.35, n.10, p. 949-62, 2015.
- KEMPF, M.; ROLAIN, J.M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, n.2, p. 105-14, 2012.
- KING, L.B.; SWIATLO, E.; SWIATLO, A.; MCDANIEL, L.S. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.55, n.3, p. 414-21, 2009.
- KOULENTI, D.; TSIGOU, E.; RELLO, J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [Epub ahead of print], doi:10.1007/s10096-016-2703-z, 2016.
- KWON, A.S.; PARK, G.C.; RYU, S.Y.; LIM, D.H.; LIM, D.Y.; CHOI, C.H.; PARK, Y.; LIM, Y. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, n.1, p.68-72, 2008.
- LABARCA, J.A.; SALLES, M.J.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v.42, n.2, p. 276-92, 2014.
- LAPPIN-SCOTT, H. M.; BASS, C. Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 4, 2001.
- LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, M.; PARK, K.S.; BAE, I.K.; KIM, Y.B.; CHA, C.J.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.1-35, 2017.
- LEE, H.W.; KOH, Y.M.; KIM, J.; LEE, J.C.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; KIM, J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.1, p. 49-54, 2008.
- LEE, Y.; KIM, C.K.; LEE, H.; JEONG, S.H.; YONG, D.; LEE, K. A novel insertion sequence, ISAbal0, inserted into ISAbal adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.55, n.1, p.361-3, 2011.
- LEITE, G.C.; OLIVEIRA, M.S.; PERDIGÃO-NETO, L.V.; ROCHA, C.K.; GUIMARÃES, T.; RIZEK, C.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. **PLoS One**, v.11, n.3, e0151270, 2016.
- LIMANSKY, A.S.; MUSSI, M.A.; VIALE, A.M. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.12, p.4776-8, 2002.

- LIN, L.; LING, B.D.; LI, X.Z. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, n.1, p.27-32, 2009.
- LIU Q.; LI, W.; FENG, Y.; TAO C. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v.9, n.12, e98091, 2014.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.
- LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiologica**, v.37, n.2, p. 119-27, 2014.
- LU, P.L.; DOUMITH, M.; LIVERMORE, D.M.; CHEN, T.P.; WOODFORD, N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.4, p.641-7, 2009.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.3, p.268-281, 2012.
- MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.45, n.12, p.3375-80, 2001.
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, p.34-9, 2001.
- MAIDEN, M.C. *Multilocus sequence typing* of bacteria. **Annual review of microbiology**, v.60, p.561-588, 2006.
- MANDELL, G.L.; VENNET, J.E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6<sup>a</sup> edição. Elsevier Churchill Livingstone, v.1, cap. 43, 2005.
- MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, n.8, p.1254-63, 2008.
- MARAKI, S.; MANTADAKIS, E.; MAVROMANOLAKI, V.E.; KOFTERIDIS, D.P.; SAMONIS, G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. **Infection & Chemotherapy**, v.48, n.8, p.190-198, 2016.

MARCHAIM, D.; POGUE, J.M.; TZUMAN, O.; HAYAKAWA, K.; LEPHART, P.R.; SALIMNIA, H.; PAINTER, T.; ZERVOS, M.J.; JOHNSON, L.E.; PERRI, M.B.; HARTMAN, P.; THYAGARAJAN, R.V.; MAJOR, S.; GOODELL, M.; FAKIH, M.G.; WASHER, L.L.; NEWTON, D.W.; MALANI, A.N.; WHOLEHAN, J.M.; MODY L, KAYE, K.S. Major variation in MICs of tigecycline in Gram-negative bacilli as a function of testing method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n.5, p. 1617-21, 2014.

MARKELZ, A.E.; MENDE, K.; MURRAY, C.K.; YU, X.; ZERA, W.C.; HOSPENTHAL, D.R.; BECKIUS, M.L.; CALVANO, T.; AKERS, K.S. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.10, p. 4707-11, 2011.

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO, A.B.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v.37, n.5, p.474-6, 2009.

MARTINS, N.; MARTINS, I.S.; DE FREITAS, W.V.; DE MATOS, J.A.; GIRÃO, V.B.; COELHO-SOUZA, T.; MARALHÃES, A.C.; CACCI, L.C.; DE FIGUEIREDO, M.P.; DIAS, R.C.; COSTA-LOURENÇO, A.P.; FERREIRA, A.L.; DALLA-COSTA, L.; NOUÉR, S.A.; SANTORO-LOPES, G.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Imported and intensive care unit-born *Acinetobacter baumannii* clonal complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n.3, p. 216-23, 2013.

MARTINS, N.; MARTINS, I.S.; DE FREITAS, W.V.; DE MATOS, J.A.; MAGALHÃES, A.C.; GIRÃO, V.B.; DIAS, R.C.; DE SOUZA, T.C.; PELLEGRINO, F.L.; COSTA, L.D.; BOASQUEVISQUE, C.H.; NOUÉR, S.A.; RILEY, L.W.; SANTORO-LOPES, G.; MOREIRA, B.M. Severe infection in a lung transplant recipient caused by donor-transmitted carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Transplant Infectious Disease**, v.14, n.3, p. 316-20, 2012.

MARTINS, N.; PICÃO, R.C.; ADAMS-SAPPER, S.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.1, p. 698-701, 2015.

MATHERS, A.J.; STOESSER, N.; SHEPPARD, A.E.; PANKHURST, L.; GIESS, A.; YEH, A.J.; DIDELOT, X.; TURNER, S.D.; SEBRA, R.; KASARSKIS, A.; PETO, T.; CROOK, D.; SIFRI, C.D. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.3, p.1656-1663, 2015.

MAYANSKIY, N.; CHEBOTAR, I.; ALYABIEVA, N.; KRYZHANOVSKAYA, O.; SAVINOVA, T.; TURENOK, A.; BOCHAROVA, Y.; LAZAREVA, A.; POLIKARPOVA, S.; KARASEVA, O. Emergence of the Uncommon Clone ST944/ST78 Carrying blaOXA-40-like and blaCTX-M-like Genes Among Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. **Microbial Drug Resistance**. doi: 10.1089/mdr.2016.0302. [Epub ahead of print]. 2017.

MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.49, n.6, p.391-405, 2013.

MICHALOPOULOS, A.; FALAGAS, M.E. Colistin and polymyxin B in critical care. **Critical Care Clinics**, v.24, n.2, p.377-91, 2008.

MONNET, D.L.; MÖLSTAD, S.; CARS, O. Defined daily doses of antimicrobials reflect antimicrobial prescriptions in ambulatory care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.6, p. 1109-1111, 2004.

MOREIRA, M.R.; GUIMARÃES, M.P.; RODRIGUES, A. A. A.; GONTIJO-FILHO, P. P. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 39-44, 2013.

MOSTACHIO, A.K.; LEVIN, A.S.; RIZEK, C.; ROSSI, F.; ZERBINI, J.; COSTA, S.F. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, n.5, p.396-40, 2012.

MOSTACHIO, A.K.; VAN DER HEIDJEN, I.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo- $\beta$  lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n.11, p.1522-1524, 2009.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.1, p.35-40, 2010.

NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, n.4, p.1027-34, 2014.

NIGRO, S.J.; HALL, R.M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.71, n.5, p. 1135-47, 2016.

NNIS, National Nosocomial Infection Surveillance System Report, Data summary from January 1992 – June 2004, issued October 2004, **American Journal Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, 2004.

NOVOVIC, K.; MIHAJLOVIC, S.; VASILJEVIC, Z.; FILIPIC, B.; BEGOVIC, J.; JOVCIC, B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. **PLoS One**, v.10, n.3, e0122793, 2015.

OBEIDAT, N.; JAWDAT, F.; AL-BAKRI, A.G.; SHEHABI, A.A. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. **American Journal of Infection Control**, v.42, n.4, p. 401-4, 2014.

ONG, D. S. Y. Antibiotic exposure and resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species in intensive care units. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 11, p. 2458-2463, 2011.

OPAZO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H.; AMYES, S.G.; GONZÁLEZ-ROCHA, G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.6, n.4, p. 311-6, 2012.

PAGANO, M.; MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.785-792, 2016.

PAGANO, M.; MARTINS, A.F.; MACHADO, A.B.; BARIN, J.; BARTH, A.L. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. **Epidemiology and Infection**, v.141, n.2, p.330-3, 2013.

PAGDEPANICHKIT, S.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANCHUEN, R. Distribution and expression of the Ade multidrug efflux systems in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, v.62, n.9, p. 794-801, 2016.

PEDROSO, S.H.; SANDES, S.H.; LUIZ, K.C.; DIAS, R.S.; FILHO, R.A.; SERUFO, J.C.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.; BOMFIM, M.R.; SANTOS, S.G. Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from human bloodstream infections. **Microbial Pathogenesis**, v.100, p.312-318, 2016.

PELEG, A.Y.; ADAMS, J.; PATERSON, D.L. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.51, n.6, p.2065-9, 2007.

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

PENDLETON, J.N.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Reviews of Anti-Infective Therapy**, v.11, n.3, p. 297-308, 2013.

PEREIRA, D. C. R. *Caracterização da resistência de isolados clínicos de Acinetobacter baumannii a antimicrobianos e desinfetante hospitalar*. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2013.

PEREZ, F.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M.; DECKER, B.K.; RATHER, P.N.; BONOMO, R.A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.10, p.3471-84, 2007.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p.826-36, 2006.

PORTO, J.P.; SANTOS, R.O.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of

antibiotics on the development of MRSA infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p.713-718, 2013.

POURNARAS, S.; IKONOMIDIS, A.; MARKOGIANNAKIS, A.; MANIATIS, A.N.; TSAKRIS, A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.6, p. 1055-6, 2005.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v.20, n.3, p.440-58, 2007.

RAMÍREZ, M.S.; MONTAÑA, S.; CASSINI, M.; CENTRÓN, D. Preferential carriage of class 2 integrons in *Acinetobacter baumannii* CC113 and novel singletons. **Epidemiology and Infection**, v.143, n.14, p. 3118-21, 2015.

RINDER, H. Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy? **Journal of Medical Microbiology**, v.50, n.12, p. 1018-20, 2001.

RODRIGUEZ, C.H.; BOMBICINO, K.; GRANADOS, G.; NASTRO, M.; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.65, n.2, p. 188-91, 2009.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; MARTÍ, S.; SOTO, S.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; CISNEROS, J.M.; PACHÓN, J.; PASCUAL, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; MCQUEARY, C.; ACTIS, L.A.; VILA, J.; SPANISH GROUP FOR THE STUDY OF NOSOCOMIAL INFECTIONS (GEIH). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.3, p.276-8, 2008.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; VELASCO, C.; PASCUAL, Á.; CANO, M. E.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.17, n.2, p.149-182, 2011.

ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; CURY, A.P.; DI GIOIA, T.S.; ALMEIDA, J.N. JR.; DUARTE, A.J. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.1, p.98-101, 2017.

ROYER, S.; FARIA, A.L.; SEKI, L.M.; CHAGAS, T.P.; CAMPOS, P.A.; BATISTÃO, D.W.; ASENSI, M.D.; GONTIJO FILHO, P.P.; RIBAS, R.M.. Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.19, n.4, p.350-7, 2015.

RUIZ, M.; MARTI, S.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; PASCUAL, A.; VILA, J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.13, n.12, p.1192-8, 2007.

RUMBO, C.; TOMÁS, M.; FERNÁNDEZ MOREIRA, E.; SOARES, N.C.; CARVAJAL, M.; SANTILLANA, E.; BECEIRO, A.; ROMERO, A.; BOU, G. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. **Infection and Immunity**, v.82, n.11, p. 4666-80, 2014.

RUZIN, A.; IMMERMANN, F.W.; BRADFORD, P.A. RT-PCR and statistical analyses of adeABC expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **Microbial Drug Resistance**, v.16, n.2, p.87-9, 2010.

RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P.A. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.5, p.1001-4, 2007.

SALZBERG, S.L.; PHILLIPPY, A.M.; ZIMIN, A.; PUIU, D.; MAGOC, T.; KOREN, S.; TREANGEN, T.J.; SCHATZ, M.C.; DELCHER, A.L.; ROBERTS, M.; MARÇAIS, G.; POP, M.; YORKE, J.A. GAGE: A critical evaluation of genome assemblies and assembly algorithms. *Genome research*, v.22, n.3, p. 557-67, 2012.

SANCHEZ, C. J. JR.; MENDE, K.; BECKIUS, M. L.; AKERS, K. S.; ROMANO, D. R.; WENKE, J. C.; MURRAY, C. K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v.29, p.13-47, 2013.

SANDIUMENGE, A.; RELLO, J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.18, n.3, p.187-93, 2012.

SAXENA, S.; BANERJEE, G.; GARG, R.; SINGH, M. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n.5, p.9-11, 2014.

SCHAFER, J.J.; GOFF, D.A.; STEVENSON, K.B.; MANGINO, J.E. Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumonia and bacteremia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Pharmacotherapy**, v.27, n.7, p.980-7, 2007.

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n.2, p.425-9, 2005.

SEIFERT, H.; DOLZANI, L.; BRESSAN, R.; VAN DER REIJDEN, T.; VAN STRIJEN, B.; STEFANIK, D.; HEERSMA, H.; DIJKSHOORN, L. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p. 4328-35, 2005.

SEN, B.; JOSHI, S. G. Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. **Journal of applied microbiology**, v.120, n.3, p.619-629, 2016.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M.J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p. 512-30, 2006.

SIROY, A.; MOLLE, V.; LEMAÎTRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONE, A.J.; JOUENNE, T.; DÉ, E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.49, n.12, p.4876-83, 2005.

SNITKIN, E.S.; ZELAZNY, A.M.; THOMAS, P.J.; STOCK, F.; NISC; HENDERSON, D.K.; PALMORE, T.N.; SEGRE, J.A. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. **Science Translational Medicine**, v.4, n.148, p.48ra116, 2012.

STEIN, A.; RAOULT, D. Colistin: an antimicrobial for the 21<sup>st</sup> century? **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.7, p. 901-902, 2002.

STEIN, G.E.; BABINCHAK, T. Tigecycline: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.75, n.4, p.331-6, 2013.

STIETZ, M.S.; RAMÍREZ, M.S.; VILACOBÁ, E.; MERKIER, A.K.; LIMANSKY, A.S.; CENTRÓN, D.; CATALANO, M. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p. 294-301, 2013.

SUN, Y.; CAI, Y.; LIU, X.; BAI, N.; LIANG, B.; WANG, R. The emergence of clinical resistance to tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.41, n.2, p. 110-6, 2013.

TOMASCHEK, F.; HIGGINS, P.G.; STEFANIK, D.; WISPLINGHOFF, H.; SEIFERT, H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. **PLoS One**, v.11, n.4, e0153014, 2016.

TSIOUTIS, C.; KRITSOTAKIS, E.I.; KARAGEORGOS, S.A.; STRATAKOU, S.; PSAROLOGAKIS, C.; KOKKINI, S.; GIKAS, A. Clinical epidemiology, treatment and prognostic factors of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.48, n.5, p. 492-497, 2016.

TUAN ANH, N.; NGA, T.V.; TUAN, H.M.; TUAN, N.S.; Y, D.M.; VINH CHAU, N.V.; BAKER, S.; DUONG, H.H. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in three hospitals in southern Vietnam. **Journal of Medical Microbiology**, v.66, n.1, p. 46-53, 2017.

TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, n.1, p.72-7, 2006.

URWIN, R.; MAIDEN, M.C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v.11, n.10, p. 479-87, 2003.

VALENCIA, R.; ARROYO, L.A.; CONDE, M.; ALDANA, J.M.; TORRES, M.J.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; GARNACHO-MONTERO, J.; CISNEROS, J.M.; ORTÍZ, C.; PACHÓN, J.; AZNAR, J.

Nosocomial outbreak of infection with pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.30, n.3, p.257-63, 2009.

VAN DESSEL, H.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T.; BAKKER, N.; PAAUW, A.; VAN DEN BROEK, P.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. **Research in Microbiology**, v.155, n.2, p. 105-12, 2004.

VASCONCELOS, A.T.; BARTH, A.L.; ZAVASCKI, A.P.; GALES, A.C.; LEVIN, A.S.; LUCAREVSKI, B.R.; CABRAL, B.G.; BRASILIENSE, D.M.; ROSSI, F.; FURTADO, G.H.; CARNEIRO, I.C.; DA SILVA, J.O.; RIBEIRO, J.; LIMA, K.V.; CORREA, L.; BRITTO, M.H.; SILVA, M.T.; DA CONCEIÇÃO, M.L.; MOREIRA, M.; MARTINO, M.D.; DE FREITAS, M.R.; OLIVEIRA, M.S.; DALBEN, M.F.; GUZMAN, R.D.; CAYÔ, R.; MORAIS, R.; SANTOS, S.A.; MARTINS, W.M. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.83, n.4, p. 382-5, 2015.

VASHIST, J.; TIWARI, V.; KAPIL, A.; RAJESWARI, M.R. Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of  $\beta$ -lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of proteome research**, v.9, n.2, p.1121-1128, 2010.

VIANA, G.F.; ZAGO, M.C.; MOREIRA, R.R.; ZARPELLON, M.N.; MENEGUCCI, T.C.; CARDOSO, C.L.; TOGNIM, M.C. ISAb1/blaOXA-23: A serious obstacle to controlling the spread and treatment of *Acinetobacter baumannii* strains. **American Journal of Infection Control**, v.44, n.5, p. 593-5, 2016.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.6, p.1210-5, 2007.

VILLALÓN, P.; VALDEZATE, S.; MEDINA-PASCUAL, M.J.; CARRASCO, G.; VINDEL, A.; SAEZ-NIETO, J.A. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.3, p.550-3, 2013.

VITRAT, V.; HAUTEFEUILLE, S.; JANSSEN, C.; BOUGON, D.; SIRODOT, M.; PAGANI, L. Optimizing antimicrobial therapy in critically ill patients. **Infection and Drug Resistance**, v.7, p.261-271, 2014.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; BALICE, M.P.; DONELLI, G.; VARALDO, P.E. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v.3, n.3, p.743-58, 2014.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n.3, p.373-83, 2006.

WANG, X.; ZONG, Z.; LÜ, X. Tn2008 is a major vehicle carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii* from China. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.69, n.2, p.218-222, 2011.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, Brasília, v.1, n.4, 2004.

WHO, World Health Organization, Collaborating center for drugs statistics methodology. anatomical Therapeutic Chemical (ATC), Classification index with Defined Daily Doses (DDD), Oslo, Norway, 2000. (Disponível em: <<https://www.whocc.no/>>).

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, n.5, p.736-55, 2011.

WRIGHT, M.S.; HAFT, D.H.; HARKINS, D.M.; PEREZ, F.; HUJER, K.M.; BAJAKSOUZIAN, S.; BENARD, M.F.; JACOBS, M.R.; BONOMO, R.A.; ADAMS, M.D. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. **MBio**, v.5, n.1, e00963-13, 2014.

YOON, E.J.; CHABANE, Y.N.; GOUSSARD, S.; SNESRUD, E.; COURVALIN, P.; DÉ, E.; GRILLOT-COURVALIN, C. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **MBio**, v.6, n.2, pii: e00309-15, 2015.

YOON, E.J.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALIN, C. RND-type efflux pumps in multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role of AdeABC overexpression and AdeRS mutations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.57, n.7, p.2989-95, 2013.

ZARKOTOU, O.; POURNARAS, S.; ALTOUVAS, G.; PITIRIGA, V.; TZIRAKI, M.; MAMALI, V.; THEMELI-DIGALAKI, K.; TSAKRIS, A. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant gram-negative pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.11, p. 3747-50, 2012.

ZARRILLI, R.; POURNARAS, S.; GIANNOULI, M.; TSAKRIS, A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.41, n.1, p.11-9, 2013.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.8, n.1, p. 71-93, 2010.

ZONG, Z.; LÜ, X.; VALENZUELA, J.K.; PARTRIDGE, S.R.; IREDELL, J. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, n.1, p.50-4, 2008.

## ANEXO I

Agentes antimicrobianos e categorias utilizadas para definir *A. baumannii* multirresistente (MDR), extensivamente resistente (XDR) e pan-resistente (PDR).

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Piperacillin-tazobactam	
	Ticarcillin-clavulanic acid	
Extended-spectrum cephalosporins	Cefotaxime	
	Ceftriaxone	
	Ceftazidime	
	Cefepime	
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole	
Penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Ampicillin-sulbactam	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
Tetracyclines	Tetracycline	
	Doxycycline	
	Minocycline	
Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Acinetobacter</i> spp. MDR: non-susceptible to $\geq 1$ agent in $\geq 3$ antimicrobial categories. XDR: non-susceptible to $\geq 1$ agent in all but $\leq 2$ categories. PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed. <a href="http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx">http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx</a> .		

Fonte: Magiorakos e colaboradores (2012).

## ANEXO II

Aprovação do protocolo de pesquisa, registro CEP/UFU 228/11.

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 735/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU  
228/11

Projeto Pesquisa: "Epidemiologia de PAVs por *Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) de adultos, clínico-cirúrgico, de um hospital universitário brasileiro".

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.  
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

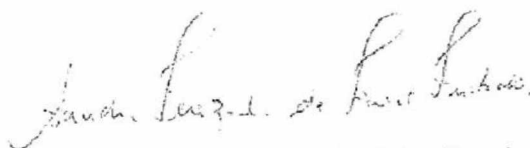
- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de Entrega de Relatório Final: **dezembro de 2012.**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de novembro de 2011.



Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU