

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

GABRIELA PIRES CARDOSO ALVES MOREIRA

**Estudo epidemiológico molecular e avaliação da produção de biofilme em
cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii***

UBERLÂNDIA

2024

GABRIELA PIRES CARDOSO ALVES MOREIRA

Estudo epidemiológico molecular e avaliação da produção de biofilme em cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC II) apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Royer

Coorientadora: Me. Vitelhe Ferreira de Almeida

UBERLÂNDIA

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M838 2024	Moreira, Gabriela Pires Cardoso Alves, 2000- Estudo epidemiológico molecular e avaliação da produção de biofilme em cepas clínicas multirresistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> [recurso eletrônico] / Gabriela Pires Cardoso Alves Moreira. - 2024. Orientadora: Sabrina Royer. Coorientadora: Vitelhe Ferreira de Almeida. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biomedicina. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Ciências médicas. I. Royer, Sabrina,1981-, (Orient.). II. Almeida, Vitelhe Ferreira de,1995-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biomedicina. IV. Título. CDU: 61
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Nilda, cuja presença foi a luz guia ao longo de toda a minha jornada. Seu amor incondicional, sua motivação constante e sua paciência infinita moldaram não apenas quem sou, mas também o caminho que escolhi seguir. Ela é meu exemplo de força, minha inspiração e meu orgulho. Nos momentos mais difíceis, foi sua mão que me ergueu e seu sorriso que trouxe leveza à minha vida. Sou eternamente grata por todo o seu esforço e dedicação, pois sei que a mulher que me tornei é um reflexo do seu amor e dedicação. Obrigada, mãe, por ser minha rocha, meu porto seguro e minha maior bênção.

À minha família, incluindo meu padrasto Sandro, meu pai Oldemiro, minha irmã e meus avós, expresso profunda gratidão por seu apoio constante e motivação ao longo dos meus estudos e aspirações. Durante a graduação, vocês foram meu pilar diário. Sem o amor e apoio de vocês, nada disso seria possível.

Aos meus amigos, em especial Andrea, Maira, Sara, Bruna, Ágatha, Sabrinna, Artur e Letícia, que se tornaram minha segunda família, quero expressar minha imensa gratidão pelo acolhimento, carinho e paciência infinita. Vocês foram uma das minhas maiores felicidades durante a jornada acadêmica, e espero tê-los ao meu lado pelo resto da vida. Amo vocês!

Gostaria também de estender meus agradecimentos à minha orientadora, Sabrina Royer, e à minha coorientadora, Vitelhe Ferreira de Almeida, por sua dedicação, paciência e orientação excepcional. Sua abertura e gentileza tornaram essa experiência muito mais enriquecedora.

Agradeço também a todos do laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL), especialmente à professora Dra. Rosineide Marques Ribas e à técnica Dra. Cristiane Silveira de Brito, pela oportunidade de participar e pelo caloroso acolhimento. Aprendi inestimavelmente com todos vocês, tanto academicamente quanto pessoalmente.

Por último, mas não menos importante, agradeço à banca de avaliação composta pela Dra. Iara Rossi Gonçalves e pelo Me. Elias Rodrigues de Almeida Junior por gentilmente aceitarem o convite para compor a banca. Sua participação foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: A persistência e a capacidade de sobrevivência de *Acinetobacter baumannii* multirresistente formador de biofilme em diversos ambientes hospitalares o tornaram uma das principais causas de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em todo o mundo.

Objetivos: Investigar os determinantes de virulência, resistência e o perfil clonal, além de analisar a produção fenotípica de biofilme em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes hospitalizados em um centro de assistência terciária localizado no estado de Minas Gerais.

Materiais e Métodos: Foram analisadas nove cepas clínicas de *A. baumannii* coletadas no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2023. Dados demográficos, clínicos e a evolução dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos. A formação fenotípica de biofilme foi avaliada através das técnicas de adesão, produção de biomassa por cristal violeta e contagem de células viáveis, enquanto a detecção de genes de virulência e resistência (*basG*, *basJ*, *plcD*, *hcp*, *tssM*, *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI* e *ptk*, *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}*) foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. A tipagem molecular foi realizada por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Resultados: Todas as cepas foram classificadas como multirresistentes, exibindo resistência aos carbapenêmicos e algumas à colistina. A maioria dos pacientes avaliados eram mulheres idosas com comorbidades, fazendo uso de dispositivos invasivos e tratadas previamente com antibióticos, e foi observada uma taxa de mortalidade de 88,9%. A produção de biofilme foi observada em 44,4% das cepas, independentemente do perfil de resistência. Todos os isolados carregavam pelo menos 10 genes de virulência, com predominância dos genes *basG*, *basJ*, *plcD*, *bfmS*, *csuE*, *adeH* e *pgaA* (100%). O gene *bla_{OXA-51}* estava presente em todas as cepas, enquanto o gene *bla_{OXA-23}* foi identificado em sete delas (66,7%). A diversidade clonal foi evidenciada pelos quatro pulsotipos (A-D) detectados, juntamente com a identificação dos clones A e B.

Conclusão: Este estudo destaca a presença de *A. baumannii* em pacientes graves, com uma frequência importante de cepas multirresistentes produtoras de biofilme que carregavam vários genes de virulência, além de uma diversidade de pulsotipos identificados. Estratégias de prevenção e controle de infecções são cruciais para conter a disseminação desses isolados em ambientes hospitalares.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; virulência; biofilme; PCR; Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.

ABSTRACT

Introduction: The persistence and survival of biofilm-forming multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital settings has made it one of the leading causes of Healthcare-associated Infections (HAIs) worldwide.

Objectives: To investigate the determinants of virulence, resistance, and clonal profile, as well as to assess the phenotypic production of biofilm in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in a tertiary care center located in the state of Minas Gerais, Brazil.

Materials and Methods: Nine clinical strains of *A. baumannii* collected from December 2021 and December 2023 were examined. Demographic and clinical data, along with the patient's clinical outcomes, were obtained from the medical records. Phenotypic biofilm formation was assessed using the adhesion, crystal violet biomass production and viable cell count techniques, while the detection of virulence and resistance genes (*basG*, *basJ*, *plcD*, *hcp*, *tssM*, *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI* and *ptk*, *bla_{OXA-51}* and *bla_{OXA-23}*) was performed using conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). Molecular typing was carried out by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Results: All the strains were classified as multidrug-resistant, showing resistance to carbapenems and some to colistin. Most of the patients evaluated were elderly women with comorbidities, using invasive devices and previously treated with antibiotics, and a mortality rate of 88.9% was observed. Biofilm production was observed in 44.4% of the strains, regardless of the resistance profile. All the isolates carried at least 10 virulence genes, with a predominance of the *basG*, *basJ*, *plcD*, *bfmS*, *csuE*, *adeH* and *pgaA* genes (100%). The *bla_{OXA-51}* gene was present in all the strains, while the *bla_{OXA-23}* gene was identified in seven of them (66.7%). Clonal diversity was evidenced by the four pulsotypes (A-D) detected, along with the identification of clones A and B.

Conclusion: This study highlights the presence of *A. baumannii* in critically ill patients, with an important frequency of biofilm-producing multidrug-resistant strains carrying several virulence genes, as well as a diversity of identified pulsotypes. Infection prevention and control strategies are crucial to mitigate the spread of these isolates in hospital settings.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; virulence; biofilm; PCR; Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. METODOLOGIA	11
3.1. Cepas bacterianas.....	11
3.2. Definições	12
3.3. Características demográficas e clínicas	13
3.4. Avaliação da produção de biofilme.....	13
3.4.1. Preparação do inóculo bacteriano	13
3.4.2. Ensaio de adesão à superfície inerte	13
3.4.3. Contagem de células viáveis no biofilme	14
3.4.4. Produção de biomassa.....	14
3.4.5. Classificação do biofilme	15
3.5. Técnicas moleculares.....	15
3.5.1. Detecção dos genes de virulência e de resistência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	15
3.5.2. Tipagem molecular.....	17
3.6. Análise estatística	18
3.7. Considerações éticas.....	18
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8. ANEXO I.....	43

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam uma das principais preocupações em relação à qualidade dos serviços e à segurança dos pacientes no Brasil e no mundo (CAVALCANTE et al., 2019). *Acinetobacter baumannii* é um dos principais agentes causadores de IRAS, classificado como Prioridade 1 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e considerado uma ameaça global devido a capacidade de adaptação e plasticidade em adquirir novos mecanismos de resistência e virulência, impactando negativamente nas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 2017; KYRIAKIDIS et al., 2021; SHADAN et al., 2023).

A. baumannii é um cocobacilo oportunista, Gram-negativo, aeróbico, pertencente ao gênero *Acinetobacter*, que abrange mais de 70 espécies, sendo essa a mais patogênica entre elas (UPMANYU et al., 2022). É um microrganismo de difícil erradicação, considerando as opções de tratamento limitadas devido ao aumento da incidência de cepas multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) no ambiente hospitalar (KYRIAKIDIS et al., 2021; MAGIORAKOS et al., 2012). *A. baumannii* também tem grande facilidade de adquirir elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, e é resistente à desinfecção e dessecação, podendo causar infecções graves como pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), bacteremia, infecção do trato urinário (ITU) e meningite (HARDING et al., 2017).

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; LEE et al., 2017). Ainda hoje, o mecanismo de resistência mais relevante presente em *A. baumannii* é a produção de β -lactamases, especialmente da classe D (oxacilinas/OXA), que hidrolisam os carbapenêmicos (LEE et al., 2017; RAMIREZ et al., 2020).

Além dos mecanismos de resistência, a virulência das cepas também contribui para sua persistência e disseminação nos hospitais, assim como possibilita a colonização e invasão das células do hospedeiro (MOUBARECK; HALAT, 2020). Para ocorrer a interação patógeno-hospedeiro, é necessário que o microrganismo secrete proteínas (toxinas) através de estruturas presentes em sua parede celular. Dentre várias vias de secreção disponíveis, destaca-se o sistema de secreção do tipo VI (SST6) (WEBER et al., 2017).

O SST6 é uma estrutura complexa que pode exportar proteínas efetoras no meio extracelular e/ou translocá-las diretamente no citoplasma das células eucarióticas hospedeiras através do contato, tendo um papel central na patogênese e competição bacteriana (KIM et al., 2017; REPIZO et al., 2019). Este sistema apresenta estrutura similar a cauda de um bacteriófago T4, e possui uma placa de base (composta de TssAEFGK), uma estrutura estabilizadora ligada à membrana (TssMJL), uma bainha contrátil (TssBC), uma proteína de reciclagem da bainha citoplasmática (TssH) e uma agulha injetável (Hcp/TssD) que é coberta por uma ponta perfurante (VgrG/TssI) (FITZSIMONS et al., 2018; REPIZO et al., 2019; PAZOKI et al., 2021). As proteínas TssM, Hcp e VgrG servem como marcadores moleculares de um sistema de secreção funcional.

Outro mecanismo indispensável para a patogênese de *A. baumannii* é a presença de sistemas de captação de ferro, essenciais para a sobrevivência das bactérias (SHADAN, et al., 2023). De forma geral, os mecanismos bacterianos de aquisição de ferro incluem: captura e extração de ferro heme de hemoproteínas; expressão de transportadores para a absorção de ferro ferroso livre; sequestro de ferro da transferrina e lactoferrina por meio de proteínas receptoras na superfície celular; e/ou através da secreção de sideróforos, pequenas moléculas de ligação de ferro (SHELDON; SKAAR, 2020). O sideróforo Acinetobactina é o sistema mais bem caracterizado em *A. baumannii* e, por ser um mecanismo de alta afinidade, permite a obtenção de ferro quando há baixa disponibilidade do metal e necessidade de disputa com células do hospedeiro (COOK-LIBIN et al., 2022). A biossíntese deste sideróforo depende da presença e expressão de vários genes, dentre eles o *basG* e *basJ* (HASAN; CHOI; OH, 2015).

Adicionalmente, algumas enzimas, como as fosfolipases, são consideradas importantes fatores de virulência em *A. baumannii*. As fosfolipases mais bem descritas neste patógeno são as pertencentes às classes A, C e D, apresentando atividade lipolítica ao afetar a integridade das membranas celulares (MOUBARECK; HALAT, 2020). As 3 classes clivam os fosfolipídios em diferentes posições, resultando na liberação de ácidos graxos e outros componentes lipídicos: a fosfolipase A hidrolisa os ácidos graxos do esqueleto do glicerol, a fosfolipase C atua na liberação do grupo fosfato após a fosforilação, enquanto a fosfolipase D cliva o grupo fosfato, gerando segundo mensageiros como o ácido fosfatídico, capaz de modular a resposta imunológica do hospedeiro, assim como contribuir para a persistência do microrganismo no soro humano (STAHL et al., 2015; MOUBARECK; HALAT, 2020).

Outro mecanismo crucial de virulência de *A. baumannii* é o biofilme, caracterizado pela formação de uma matriz de exopolissacarídeos autoproduzidos que envolvem um conjunto de microrganismos (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). Essa estrutura permite a adesão do patógeno a uma variedade de superfícies, tanto bióticas quanto abióticas (MEA et al., 2021; CHOUDHARY et al., 2022). A capacidade de formar biofilme contribui significativamente para a resistência e sobrevivência de *A. baumannii* em ambientes hospitalares e dispositivos médicos, aumentando o risco de infecções e surtos (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014).

A formação do biofilme em *A. baumannii* é influenciada por proteínas codificadas por diversos genes essenciais e que incluem: o sistema de montagem CsuA/BABCDE, regulado por um sistema de dois componentes (BfmS/BfmR); a proteína de membrana associada ao biofilme - Bap; AbaI, que faz parte do sistema de *quorum sensing* (QS); o operon pgaABCD, que é essencial para aderência célula-célula; a bomba de efluxo adeFGH, desempenhando um papel importante na resistência antimicrobiana; e a proteína tirosinoquinase PTK, responsável pela formação da cápsula bacteriana (ROY et al., 2023; MENDES et al., 2023; UPMANYU et al., 2022). O ambiente também desempenha um papel crucial na formação do biofilme. Fatores como pH, temperatura, concentração de nutrientes e presença de metais podem modular a expressão de genes relacionados ao biofilme e influenciar na sua formação e estabilidade (UPMANYU et al., 2022). Além disso, a comunicação celular, através do sistema *quorum sensing*, desempenha um papel na coordenação do comportamento celular bacteriano durante a formação do biofilme, permitindo uma resposta coordenada às mudanças no ambiente e a formação de biofilmes robustos e persistentes (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; COLQUHOUN; RATHER, 2020).

Assim, dados sobre a disseminação de isolados multirresistentes de *A. baumannii* e suas características fenotípicas e genotípicas, incluindo os genes associados à virulência conforme demonstrado no Quadro 1, fornecerão *insights* pertinentes sobre as particularidades desse patógeno, além de contribuir para orientar potenciais intervenções que possam impactar o prognóstico dos pacientes.

Quadro 1. Genes associados à virulência em *A. baumannii*

Gene	Produto gênico	Função	Referência
<i>basG</i>	Absorção de Ferro	Gene de biossíntese de acinetobactina	CONDE-PÉREZ et al., 2021

<i>basJ</i>	Absorção de Ferro	Gene de biossíntese de acinetobactina	CONDE-PÉREZ et al., 2021
<i>plcD</i>	Fosfolipase	Auxilia na invasão de células hospedeiras; sistema de secreção	MENDES et al., 2023; ZHU et al., 2022
<i>hcp</i>	Associada ao SST6	Proteína estrutural do T6SS	FITZSIMONS et al., 2018
<i>tssM</i>	Associado ao TSST6	Proteína estrutural do T6SS	FITZSIMONS et al., 2018
<i>bfmS</i>	Sistema de regulação BfmRS	Formação e manutenção do biofilme em superfícies inanimadas	ROY et al., 2022
<i>bap</i>	Proteína associada ao biofilme	Aderência; formação e maturação do biofilme	ABDELAZIZ et al., 2022
<i>csuE</i>	Sistema de transporte e montagem de pili (fímbrias)	Montagem de pili e formação de biofilme em superfícies abióticas	DE BREIJ et al., 2009; ABDELAZIZ et al., 2022
<i>csuA</i>	Sistema de transporte e montagem de pili (fímbrias)	Montagem de pili e formação de biofilme em superfícies abióticas	DE BREIJ et al., 2009; ABDELAZIZ et al., 2022
<i>adeH</i>	Sistema de efluxo	Associada a bomba de efluxo; codificação de proteína relacionada à resistência a antibióticos	SHAN et al., 2022
<i>pgaA</i>	Polissacarídeos	Estimula a formação de polímeros dos principais componentes da matriz extracelular	MEA et al., 2021
<i>abaI</i>	Sistema de comunicação celular	Regulação do sistema <i>quorum sensing</i>	MENDES et al., 2023
<i>ptk</i>	Gene associado à formação de cápsula	Polimerização e montagem da cápsula	KHOSHNOOD et al., 2022

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo investigar os determinantes de virulência, resistência e o perfil clonal, além de analisar a produção fenotípica de biofilme em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes hospitalizados em um centro de assistência terciária localizado no estado de Minas Gerais.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar as características demográficas, clínicas e a evolução dos pacientes acometidos por infecções graves causadas por *A. baumannii*;
- Analisar e comparar a formação fenotípica de biofilme por cepas clínicas de *A. baumannii* através das técnicas de adesão, produção de biomassa por cristal violeta e contagem de células viáveis;
- Avaliar a presença de genes de virulência *basG*, *basJ*, *plcD*, *hcp*, *tssM*, *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI* e *ptk*, e de resistência *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}*, nas cepas clínicas de *A. baumannii* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional;
- Investigar a relação entre a formação fenotípica de biofilme e a presença dos genes de virulência relacionados;
- Identificar o perfil clonal dos isolados clínicos de *A. baumannii* através da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE);
- Relacionar os padrões de resistência aos antibióticos com os pulsotipos obtidos pela técnica de PFGE.

3. METODOLOGIA

3.1. Cepas bacterianas

Foram avaliadas neste estudo nove cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* obtidas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2023, e recuperadas do Setor de Microbiologia do

Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. As cepas foram selecionadas a partir de dados preliminares como perfil de resistência e sítio de infecção (Tabela 1).

As bactérias recuperadas foram sub-cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), utilizando a técnica de esgotamento, para a obtenção de culturas puras e posteriormente, armazenadas em criotubos com caldo BHI acrescido de 15% de glicerol, seguindo-se incubação a 37°C durante 18 horas (*overnight*). A suspensão resultante foi estocada a temperatura de -80°C até utilização nos demais experimentos propostos (KONEMAN et al., 2001).

Tabela 1. Caracterização das cepas clínicas selecionadas para o estudo

Cepa	Data de Isolamento	Sítio de Infecção	Unidade de Internação	Perfil de Resistência
H17	20.12.2021	Sangue	SE	APS; CFP; CIP; IMP; MER
H05	18.03.2022	Sangue	UTI	APS; CPM; CIP; GEN; IMP; MER
H26	27.03.2022	Sangue	UTI	APS; CPM; CIP; GEN; IMP; MER
H19	04.04.2022	Sangue	ONCO	APS; CPM; CIP; IMP; MER
H11	16.04.2022	Sangue	SE	APS; CPM; CIP; IMP; MER
H14b	29.04.2022	Sangue	PS	APS; CPM; CIP; IMP; MER
U23	09.06.2023	Urina	CM	AMI; COL; GEN; MER
C12	17.06.2023	ST	PS	AMI; COL; MER; TIG*
C27	19.06.2023	ST	PS	AMI; COL; MER

ST, secreção traqueal; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; ONCO, Oncologia; SE, Sala de Emergência; PS, Pronto Socorro; CM, Clínica Médica; AMI, amicacina; APS, ampicilina/sulbactam; CFP, cefoperazone; CPM, cefepime; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MER, meropenem; *TIG, tigeciclina, este antimicrobiano não consta nas categorias estabelecidas por Magiorakos e colaboradores (2012); COL, colistina.

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 (ciprofloxacina e levofloxacina), Penicilinas antipseudomonas/Inibidores de β -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 β -lactamases (ampicilina-sulbactam), Polimixinas (colistina e polimixina B), Tetraciclina (tetraciclina, doxiciclina, minociclina) (MAGIORAKOS et al., 2012).

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

***Acinetobacter baumannii* pan-resistente (PDR):** resistência a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas mencionadas (MAGIORAKOS et al., 2012).

3.3. Características demográficas e clínicas

As variáveis demográficas, clínicas, fatores de risco e evolução dos pacientes cujos isolados foram incluídos neste estudo, foram avaliadas por meio da análise do banco de dados disponível no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU e dos prontuários médicos.

3.4. Avaliação da produção de biofilme

As 9 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* foram selecionadas para a realização dos ensaios de produção de biofilme. Como controle positivo foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 e como controle negativo apenas o meio de cultura (caldo TSB) sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada segundo o protocolo proposto por Rodríguez-Baño e colaboradores (2008) com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Todos os experimentos foram repetidos em três ensaios independentes.

3.4.1. Preparação do inóculo bacteriano

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

3.4.2. 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, 15 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em caldo TSB. 200 μ 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*) por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). E em seguida foram realizadas diluições seriadas e as suspensões celulares foram plaqueadas em agar TSA (*Tryptic Soy Agar*) para enumeração das células.

3.4.3. 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 μ L dessa suspensão de células foram inoculadas 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). E em seguida foram realizadas diluições seriadas e as suspensões celulares foram plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

3.4.4. Produção de biomassa

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria teste foi inoculada em 8 poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados três 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 foram secas em posição invertida à temperatura ambiente. Em seguida, 200 μ L de uma solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados com água destilada estéril e secos à temperatura ambiente. 200 μ L de solução de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente. 100 μ L da solução de cristal

violeta solubilizado foram transferidos para nova placa e a absorbância foi avaliada em leitor a 560 nm com solução de ácido acético 33% como branco.

3.4.5. 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), com modificações (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios para classificação da produção de biofilme

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO_i^1 \leq DO_c^2$	Não produtor / Biomassa indetectável*
$DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$	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; ¹DO_i da amostra; ²DO_c do controle negativo.*A biomassa pode não ter sido detectada por limitações técnicas (vide discussão).

3.5. Técnicas moleculares

3.5.1. Detecção dos genes de virulência e de resistência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para avaliar a presença dos genes de virulência *basG*, *basJ*, *plcD*, *hcp*, *tssM*, *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk* e *plcD*, e de resistência *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}, foram realizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com *primers* consensos para cada gene (Tabela 3). A maioria dos *primers* para os genes de virulência foram desenhados e validados *in silico* para este estudo. Foram utilizados reagentes para um volume final de reação de 25 µL, conforme descrito na tabela 4. Como controle positivo dos ensaios foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606.

Tabela 3. Lista de primers utilizados nesse estudo

Gene	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>basG</i>	F: AGCGCAAATCGGAATCATGC R: TGGCCAGACACACAAATCGA	55°C	138	SHELDON; SKAAR., 2020
<i>basJ</i>	F: GCCCGCAATTTGCATAAAGC R: ACCCAAAGACATGAGTGCAC	55°C	126	Este estudo
<i>plcD</i>	F: TGTCATGTTGGTTGGAGCTG R: AACGGTGTGTGTTGAGCACTG	55°C	113	Este estudo
<i>hcp</i>	F: TGCTGAGCGTGTGTAACATT R: ACGTTTATCGCCATTTGCAC	53°C	142	Este estudo
<i>TssM</i>	F: ATGCTTTGGCGCAGTAAGAC R: TCACTTTGTCCACCAGTTGC	55°C	127	Este estudo
<i>bfmS</i>	F: TGCCGTTAGAGCGCAAAATC R: TTGCCATTTTCATCGCTTCCC	55°C	105	Este estudo
<i>bap</i>	F: ACCCAGGTTTGAATGATGGC R: TTGCTGGGCCTGATGTATTG	55°C	75	Este estudo
<i>CsuE</i>	F: TCTTTTTAGCGGGCCTGAT R: TTAAACGGTGAGTCGGCTTG	55°C	99	Este estudo
<i>CsuA</i>	F: GCGGGTGAAATCGGAGCTAA R: ACCCCTTTAAAAGCTGTGGT	50°C	146	Este estudo
<i>adeH</i>	F: AGCAAACCTCGTGGTGAATGG R: TTTGCTGCCACCGCTTTTAG	55°C	106	Este estudo
<i>pgaA</i>	F: TTAGAGGGCGTTCAAAAGCG R: AGCAAACCTCGGCCTTTTTCG	55°C	137	Este estudo
<i>abaI</i>	F: CAAATCCGCCTTCCTCTAGC R: TTTGCGCCTTGTTCTCTTGC	52°C	98	Este estudo
<i>ptk</i>	F: AGTTGCACGTTTCGGTTAACC R: ACCTGCTCAGTTCGCAAAAG	55°C	127	Este estudo
<i>bla_{OXA-51}</i>	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	50°C	353	WOODFORD et al., 2006
<i>bla_{OXA-23}</i>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	48°C	501	WOODFORD et al., 2006

Tabela 4. Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase

Reagentes	Volume	Concentração final
DNA ¹	-	-
<i>primer forward</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
<i>primer reverse</i> (10 uM)	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.

¹Parte de uma colônia bacteriana isolada.

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 90V por cerca de 40 minutos em gel de agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100 mL de tampão e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

3.5.2. Tipagem molecular

As cepas foram tipadas por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) (SILVA et al., 2024), após a digestão do DNA genômico com a enzima *ApaI* (Promega®). Os fragmentos de DNA foram separados em géis de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE [Tris-borato-etilenodiamina tetraacético (EDTA)] a 0,5% utilizando o aparelho CHEF DRIII (Bio-Rad, Hercules, CA) com uma voltagem de 5 V/cm, com pulsos variando de 5s a 35s, por um período de 20 horas a 14°C. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. A análise computacional foi realizada utilizando o software Gel Analyzer (versão 23.1) (IZTVAN; IZTVAN, 2022). A comparação dos padrões de bandas foi realizada através do método de agrupamento não ponderado com médias aritméticas (UPGMA) utilizando o coeficiente de similaridade de Dice. Os padrões de

eletroforese em gel de campo pulsado foram definidos como isolados com uma similaridade de 80% ou superior no dendrograma (TENOVER et al., 1995).

3.6. Análise estatística

Os dados epidemiológicos coletados foram tabulados em uma planilha Microsoft Excel (Microsoft Corp, Washington). Para a avaliação do biofilme, 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 um intervalo de confiança de 95%, considerando significativo $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism[®] 9.0 (San Diego, CA) .

3.7. Considerações éticas

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) aprovou o trabalho sob o número de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 68181322.6.0000.5152 (ANEXO I).

4. RESULTADOS

Dos 9 isolados clínicos recuperados de pacientes internados no HC-UFU e avaliados neste estudo, 6 foram isoladas de infecção de corrente sanguínea, 2 de pneumonia e 1 de colonização do trato urinário, conforme demonstrado na Tabela 1. Todas as cepas foram classificadas como MDR, exibindo resistência aos carbapenêmicos. Dentre elas, três também apresentaram resistência à colistina (polimixina E). As unidades de internação dos pacientes variaram, abrangendo desde a sala de emergência (SE), clínica médica (CM), pronto socorro (PS), oncologia (ONCO) até a unidade de terapia intensiva (UTI).

Em relação às características dos pacientes, a média de idade foi de 65 anos. A maioria era composta por mulheres (55,6%), com diagnóstico de internação clínico. 66,7% deles tiveram histórico de cirurgia prévia e haviam sido submetidos a pelo menos um procedimento invasivo, sendo a sonda nasogástrica/nasoenteral (SNG/SNE) (66,7%) e o cateter venoso central (CVC)

(55,6%) os mais comuns. Todos os pacientes apresentaram comorbidades, sendo a nefropatia a mais prevalente (88,9%). A maioria havia utilizado antibióticos previamente, destacando-se o uso de glicopeptídeos, polimixina B e piperacilina/tazobactam (44,4%). A média de tempo de hospitalização foi de 37 dias e 8 dos 9 pacientes evoluíram para óbito (88,9%) (Tabela 5).

Tabela 5. Características demográficas e clínicas dos pacientes selecionados para o estudo e internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2023.

Características	Total N = 9 (%)
Idade (anos; média ± DP*)	69,5 ± 21,1
Sexo	
Feminino	5 (55,6)
Masculino	4 (44,4)
Diagnóstico de internação	
Clínico	7 (77,8)
Trauma	2 (22,2)
Cirurgia prévia	6 (66,7)
Procedimentos invasivos	
Hemodiálise	4 (44,4)
Traqueostomia	2 (22,2)
Nutrição Parenteral	1 (11,1)
Dispositivos Invasivos	
Nutrição Parenteral	1 (11,1)
Ventilação mecânica	4 (44,4)
Cateter Venoso Central	5 (55,6)
Dreno	2 (22,2)

continua

Características (Continuação)	Total N = 9 (%)
Sonda nasogástrica/nasoentérica	6 (66,7)
Sonda vesical de demora	0 (0,0)
Comorbidades	
Cardiopatia	1 (11,1)
Nefropatia	8 (88,9)
Diabetes	3 (33,3)
Neoplasia	4 (44,4)
Vascular	3 (33,3)
Uso prévio de antibióticos	
Cefalosporinas	3 (33,3)
Carbapenêmicos	3 (33,3)
Glicopeptídeos	4 (44,4)
Fluoroquilonas	0 (0)
Polimixina B	4 (44,4)
Piperacilina/Tazobactam	4 (44,4)
Aminoglicosídeos	2 (22,2)
Dias de hospitalização (média ± DP)	37,4 ± 27,8
Evolução	
Alta	1 (11,1)
Óbito	8 (88,9)

*DP: desvio-padrão.

Todas as cepas recuperadas foram utilizadas para a avaliação fenotípica da formação de biofilme, na detecção dos genes de virulência associados ao biofilme e de resistência por meio da

técnica de PCR convencional, assim como para a determinação da relação genética através do PFGE.

Para o ensaio de biofilme, no período de 2 horas, observou-se que todas as cepas de *A. baumannii* avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada (Fig. 1A). As cepas H05, H14b, C12 e C27 apresentaram significativamente mais células aderidas do que o controle (ATCC 19606) (Fig. 1A). Adicionalmente, todas apresentaram um número superior de células viáveis após 24 horas de incubação, quando comparadas ao ensaio de adesão, mas, em sua maioria, estatisticamente inferior ao controle (Fig. 1B). Em relação à quantificação da produção de biomassa, avaliada pelo ensaio de cristal violeta, foi possível inferir que as cepas H17, H26, H19, H11, H14b, C12 e C27 foram capazes de produzir estatisticamente uma menor quantidade de biomassa quando comparadas ao controle (Fig. 1C).

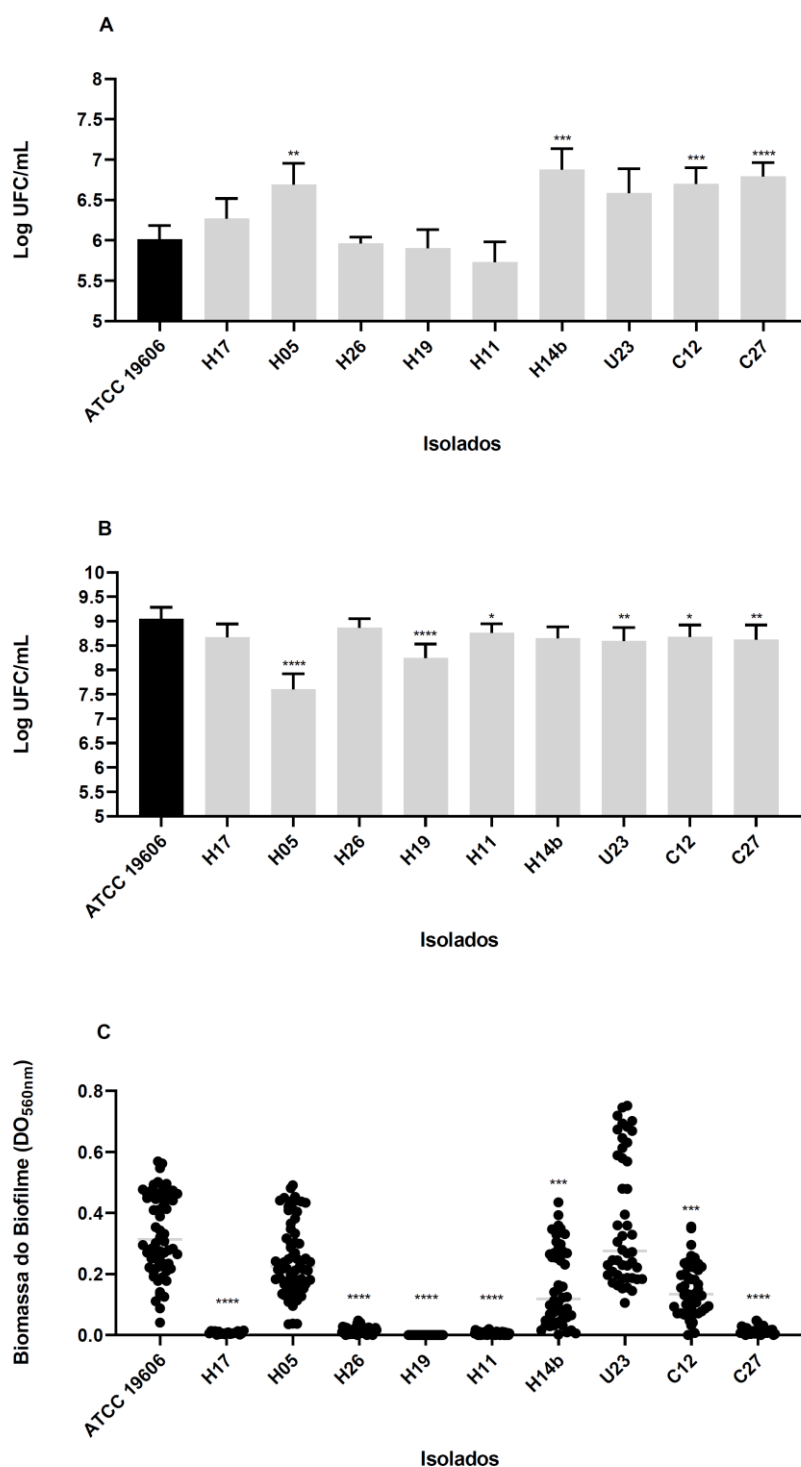


Figura 1. Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 9 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. (A) Número de células aderidas em placas de poliestireno após 2 h de contato; (B) Concentração celular do biofilme; (C) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{560nm}). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$, no teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizado como controle.

A média da densidade da biomassa do biofilme das cepas de *A. baumannii* foi de $0,13 \pm 0,07$. A produção de biofilme, avaliada pelo método quantitativo, revelou que 2 isolados (22,2%; 2/9) foram classificados como moderados produtores de biofilme, assim como o controle ATCC 19606, 2 (22,2%; 2/9) foram considerados fraco produtores, e 5 isolados (55,5%; 5/9) não-produtores de biofilme (Tabela 6).

A amplificação dos genes de virulência (*basG*, *basJ*, *plcD*, *hcp*, *tssM*, *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI* e *ptk*) por PCR revelou que todos os 9 isolados clínicos de *A. baumannii* carregavam pelo menos 10 desses genes (Tabela 6). Os genes mais prevalentes foram *basG*, *basJ*, *plcD*, *bfmS*, *csuE*, *adeH* e *pgaA*, presentes em todas as cepas. A ocorrência dos genes *hcp*, *tssM*, *csuA* e *abaI* foi de 77,7% (7/9), enquanto *ptk* e *bap* foram detectados em 88,8% (8/9) dos isolados. As cepas H17, H26 e H19 apresentaram todos os 13 genes de virulência pesquisados. Além disso, todas as cepas testadas foram positivas para o gene *bla*_{OXA-51}, enquanto 3 isolados (H26, H05 e H14b) foram negativos para o gene *bla*_{OXA-23}.

Não foi observada relação entre a habilidade de produção de biofilme, o perfil de resistência, e a presença dos genes de virulência.

Tabela 6. Produção de biofilme, fenótipo de resistência e presença de determinantes de virulência e resistência em cepas clínicas de *A. baumannii*

Cepas	DO ¹	Produção de biofilme	Fenótipo de Resistência ²	Genes de virulência										Genes de resistência				
				<i>basG</i>	<i>basJ</i>	<i>plcD</i>	<i>hcp</i>	<i>tssM</i>	<i>bfmS</i>	<i>bap</i>	<i>csuE</i>	<i>csuA</i>	<i>adeH</i>	<i>pgaA</i>	<i>abaI</i>	<i>ptk</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}
ATCC 19606	0,33	Moderado	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H17	0,008	Não produtor	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H05	0,25	Moderado	MDR	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
H26	0,02	Não produtor	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H19	0,0	Não produtor	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H11	0,006	Não Produtor	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H14b	0,16	Fraco	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
U23	0,37	Moderado	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C12	0,15	Fraco	MDR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C27	0,01	Não produtor	MDR	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

¹Média da densidade óptica; ²MDR:multidrug-resistance, multirresistente. + (detecção do gene). - (gene não detectado).

Para determinar a relação genética entre os isolados testados, empregou-se a técnica de PFGE, que revelou quatro pulsotipos distintos (A-D) (Figura 2). A cepa H17 foi não tipável. As cepas do ano de 2022 exibiram os pulsotipos B, C, D e o subtipo D1. Os isolados H19 e H11, pertencentes ao pulsotipo B, apresentaram mesmo perfil de resistência, foram identificados em intervalos próximos de tempo (cerca de 15 dias de diferença), e em unidades hospitalares distintas, ONCO e SE, respectivamente. O subtipo B1 foi identificado em 2023 na cepa U23. Os pulsotipos C e D, dos isolados H26 e H05, respectivamente, foram recuperados de pacientes internados na UTI em intervalos próximos (menos de 15 dias) durante o ano de 2022. Nesse mesmo ano, observou-se o subtipo D1 na cepa H14b. O pulsotipo A, encontrado nas cepas MDR C12 e C27, resistentes à colistina, foi identificado quase simultaneamente no PS em 2023. Além disso, destacamos a presença de dois clones, A e B, em amostras de sangue e secreção traqueal e de anos distintos, 2023 e 2022, respectivamente.

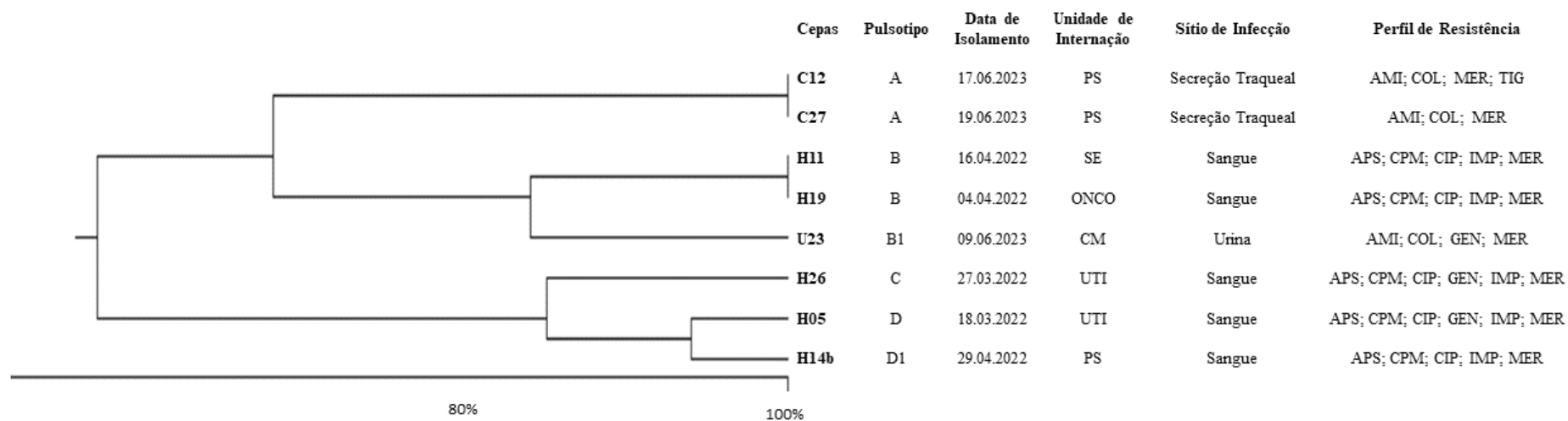


Figura 2. Dendrograma resultante de análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), pulstipo, data de isolamento, unidade de internação, sítio de infecção e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Escala representa as porcentagens de similaridade. PS, Pronto Socorro; SE, Sala de Emergência; ONCO, Oncologia; CM, Clínica Médica; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; AMI, amicacina; APS, ampicilina/sulbactam; CPM, cefepime; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MER, meropenem; TIG, tigeciclina; COL, colistina.

5. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é um desafio significativo para a saúde pública em todo o mundo, devido à sua considerável repercussão clínica e econômica (SERRA-BURRIEL, et al., 2020). Assim, diante do aumento na incidência de cepas de *A. baumannii* MDR resistentes aos carbapenêmicos, esse patógeno se tornou Prioridade 1 para a OMS, por ser uma ameaça global e devido as opções limitadas de tratamento para infecções graves (WHO, 2017; MOUBARECK; HALAT, 2020). As polimixinas continuam sendo a última opção terapêutica, mas a emergência de isolados de *A. baumannii* resistentes à colistina tem sido relatada em todo o mundo (LIN; LAN, 2014). Neste estudo, foram avaliadas cepas MDR, resistentes aos carbapenêmicos, e algumas resistentes à colistina, representando um grande risco aos pacientes e um desafio para o tratamento das infecções.

De acordo com a literatura, os fatores de risco reconhecidos associados às infecções por *A. baumannii* incluem procedimentos invasivos, como uso de dispositivos médicos invasivos e da terapia de hemodiálise, hospitalização prévia, presença de comorbidades, idade avançada, tempo prolongado de internação hospitalar e em UTI, uso prévio de antibióticos de amplo espectro, cirurgias prévias e nutrição parenteral (DA SILVA et al., 2018; BENAÏSSA et al., 2023; GHARAIBEH et al., 2024). Esses fatores também foram observados nos pacientes avaliados neste estudo, destacando-se a alta mortalidade observada, de cerca de 90%. Outros trabalhos demonstraram que as estimativas de mortalidade entre pacientes com infecções causadas por *A. baumannii* variaram de 26,0% a 55,7%, valores inferiores aos observados neste estudo (FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007; DA SILVA et al., 2018; ROSSI et al., 2019; APPANEAL et al., 2022; ALRAHMANY et al., 2022).

As características de *A. baumannii* como um patógeno multirresistente e invasivo, causador de uma variedade de infecções graves, incluindo pneumonia, sepse, meningite, infecções do trato urinário e de feridas, ressaltam a importância de se compreender os mecanismos que conferem resistência a esse microrganismo, especialmente aos carbapenêmicos (JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022). Nossos resultados evidenciaram que de todas as cepas recuperadas de amostras clínicas diversas carregavam o gene *bla_{OXA-51}*, reconhecido como marcador da espécie, enquanto 66,7% apresentaram o gene *bla_{OXA-23}*, responsável pela codificação da principal carbapenemase associada a uma variedade de surtos em todo o mundo. Esses achados estão em concordância com dados

previamente divulgados na literatura (ROYER et al., 2018; SHARMA et al., 2023). Assim como de Freitas e colaboradores (2020), que constataram a ausência do gene *bla_{OXA-23}* em cepas resistentes aos carbapenêmicos, sugerimos que uma explicação plausível pode estar associada à hiperexpressão de bombas de efluxo ou à perda de porinas. Ambos são mecanismos descritos que também contribuem para o aumento da resistência bacteriana, sobretudo frente ao meropenem e imipenem (YOON et al., 2015; NOVOVIC et al., 2015; ROYER et al., 2018).

Além dos mecanismos de resistência, a presença de fatores de virulência, como a habilidade de formar biofilme, associado à sua capacidade de persistir em ambientes hospitalares e dispositivos médicos, pode desempenhar um papel crucial na emergência e propagação de fenótipos multirresistentes no ambiente hospitalar (VUOTTO et al., 2014; BADAVE; KULKARNI, 2015; DUARTE et al., 2016). Neste estudo, ao avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *A. baumannii in vitro*, constatamos que 44,4 % dos isolados foram capazes de formar biofilme. Resultados mais elevados foram encontrados em outros estudos com taxa de formação de biofilme variando de 55 a 75% (SANCHEZ et al., 2013, DUARTE et al., 2016; CASTILHO et al., 2017; EZE et al., 2021).

Todos os isolados testados demonstraram capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada e apresentaram um número considerável de células viáveis após 24 horas de incubação, independentemente do perfil de resistência. Para quantificar a biomassa do biofilme, foi utilizada a metodologia do cristal violeta (CV). A coloração em microplacas é o método mais empregado na análise da produção de biofilme em diversas bactérias e condições, entretanto, não é isenta de falhas e limitações (AZEREDO et al., 2017; OMMEN; ZOBK; MEYER, 2017).

Os isolados H17, H26, H19, H11 e C27 foram identificados como não-produtores de biofilme, sugerindo possíveis inadequações na técnica de coloração, especialmente durante a etapa de lavagem do CV. Essa etapa, destinada a remover fragmentos de células mortas e células não aderidas, pode inadvertidamente deslocar e remover algumas células bacterianas sésseis, comprometendo a precisão dos resultados (AZEREDO et al., 2017; AMADOR et al., 2021). Técnicas alternativas, como o uso de safranina e coloração fluorescente, têm obtido bons resultados (AZEREDO et al., 2017; OMMEN; ZOBK; MEYER, 2017; AMADOR et al., 2021), embora sua aplicação neste trabalho tenha sido inviável devido a restrições técnico-financeiras.

A análise da presença dos genes de virulência, incluindo aqueles associados ao biofilme, como *plcD*, *bfmS*, *CsuE*, *adeH* e *pgaA*, revelou que todos estavam presentes em 100% das cepas

avaliadas neste estudo, confirmando os resultados encontrados por Zhu e colaboradores (2022), que identificaram os genes *plcD*, *adeH* e *pgaA* em 100%, 98,7% e 98,7% das cepas investigadas, respectivamente. Adicionalmente, Li e colaboradores (2021) também observaram significativa positividade para os genes *bfmS* (84,6%) e *csuE* (91,3%), resultados alinhados com os nossos achados. Em outra pesquisa, Zeighami e colaboradores (2019) destacaram que o gene mais prevalente foi o *csuE* (100%).

Outros genes associados à formação de biofilme, como *csuA* (77,7%), *abaI* (77,7%), *ptk* (88,8%) e *bap* (88,8%), foram detectados em um número significativo de isolados examinados. Porcentagens semelhantes foram descritas em estudos anteriores como de Li e colaboradores (2021) para os genes *csuA* (73,1%) e *abaI* (70,2%), o de Yang e colaboradores (2019) para o gene *bap* (79,2%), e o de Zeighami e colaboradores (2019) para o gene *ptk* (95%).

Vários genes de virulência são descritos como cruciais na habilidade de formação de biofilme em cepas de *A. baumannii*. O gene *bfmS* integra um sistema de regulação de dois componentes (BfmRS), participando de diversas vias metabólicas em *A. baumannii*, e está fortemente associado à formação e manutenção do biofilme (PEREZ MORA et al., 2023). Por sua vez, o gene *bap* codifica uma proteína fundamental para a formação e maturação de biofilmes em diversas superfícies, além de desempenhar papel crucial nas interações célula-célula (ROY et al., 2022). Os genes *csuA* e *csuE* fazem parte do sistema de montagem de pili *csuA/BABCDE* e são considerados essenciais para a adesão das bactérias em superfícies abióticas (TOMARAS et al., 2008; DOLMA et al., 2022). O gene *adeH* faz parte da bomba de efluxo AdeFGH, conferindo resistência a diversas drogas e contribuindo para a síntese e transporte de moléculas autoindutoras (ROY et al., 2022). Além disso, o gene *plcD* codifica uma fosfolipase com atividade lipolítica, desempenhando papel crucial no processo de invasão celular por *A. baumannii* (JACOBS et al., 2010). Já o gene *pgaA*, componente do locus *pgaABCD*, codifica proteínas envolvidas na síntese de poli- β -(1,6)-N-acetilglicosamina (PNAG), um dos principais constituintes da matriz extracelular, essenciais para a formação e manutenção do biofilme (UPMANYU et al., 2022). O gene *AbaI*, integrante do sistema de *quorum sensing* *AbaI/AbaR*, potencializa a formação de biofilme conferindo-lhe uma estrutura mais robusta, com maior produção de polissacarídeos extracelulares e resistência (ROY et al., 2022). Também, o gene *ptk*, um dos elementos essenciais para a biossíntese da cápsula, que desempenha um papel significativo na formação de biofilme especialmente em isolados multirresistentes (ZEIGHAMI et al., 2019; MENDES et al., 2023).

Neste trabalho, observamos que mesmo em cepas que carregavam diversos genes de virulência, a habilidade de formar biofilme em superfícies de poliestireno não foi observada. Isso sugere que outros fatores, como regulação negativa de genes, influência do ambiente ou mutações específicas, possam afetar suas funções (LIOU et al., 2014; ROY et al., 2022).

Outros genes de virulência também foram identificados nesta pesquisa, destacando-se a presença dos genes *basG*, *basJ*, *hcp* e *tssM*. Observou-se que os genes *basG* e *basJ* estavam presentes em 100% dos isolados testados, enquanto *hcp* e *tssM* estavam presentes em 77,7% deles. Esses achados são consistentes com os resultados do estudo conduzido por Zhu e colaboradores (2022), que demonstraram a presença do gene *basJ* em 100% dos isolados, e com o estudo de Hu e colaboradores (2018), onde o gene *hcp* foi identificado em 77,9% dos isolados. Os genes *basG* e *basJ* estão envolvidos na biossíntese do sideróforo acinetobactina, fundamental para a aquisição de ferro, o que viabiliza a sobrevivência de *A. baumannii* em ambientes com escassez desse metal (HASAN et al., 2015). Por outro lado, os genes *hcp* e *tssM* codificam as proteínas homônimas, componentes do sistema de secreção do tipo 6 (SST6), que é responsável por mediar, via interação célula-célula, a transferência de toxinas letais para outras bactérias, visando autoproteção e competitividade (REPIZO 2019; WEBER et al., 2017; FITZSIMONS et al., 2018).

Estudos epidemiológicos utilizam técnicas moleculares, como o PFGE, para investigar surtos e determinar o perfil clonal de patógenos, possibilitando comparações entre bactérias de diferentes fontes e auxiliando no controle de infecções ao identificar suas origens e rotas de transmissão (NEOH et al., 2019). Neste estudo, os resultados da técnica de PFGE revelaram uma diversidade clonal marcante, evidenciando a prevalência e disseminação de quatro pulsotipos distintos (A-D), juntamente com a identificação de dois clones, A e B. Esses resultados confirmam os achados de Bardbari e colaboradores (2020) e Royer e colaboradores (2015), os quais não apenas identificaram diversos pulsotipos, mas também evidenciaram que o ambiente hospitalar é frequentemente colonizado por vários clones de *A. baumannii*, cuja disseminação pode ocorrer por meio de profissionais de saúde, equipamentos ou fômites contaminados. Outra constatação relevante foi a detecção do pulsotipo A, presente em cepas resistentes à colistina, com um perfil de resistência similar, provenientes de pacientes internados no PS. Com a implementação de medidas de prevenção e controle, bem como o isolamento dos pacientes, foi possível restringir o clone a essa unidade hospitalar. Apesar desse achado, a associação entre a tipagem pelo PFGE e os perfis

de resistência aos antibióticos não revelou uma conexão direta entre os padrões de resistência e os outros pulsotipos identificados.

As conclusões deste estudo, embora baseadas em um número limitado de cepas e restrito a um único hospital, suscitam questões relevantes sobre a interação entre os mecanismos de virulência e resistência, bem como a capacidade de disseminação dos microrganismos em ambientes hospitalares. Aprofundar a análise genética e os mecanismos de regulação gênica é fundamental para ampliar a compreensão desses fenômenos. Destaca-se neste estudo a abordagem de um número significativo de genes de virulência, associados à formação de biofilme e às habilidades de sobrevivência e competição de *A. baumannii*. Além disso, a diversidade de pulsotipos e clones identificados sugere que a contaminação cruzada entre diferentes ambientes pode ter sido mediada de forma indireta por meio de ambientes contaminados e profissionais de saúde. Dessa forma, aprimorar a qualidade dos cuidados de saúde demanda estratégias de prevenção bem planejadas e práticas estabelecidas de controle de infecções, sendo medidas essenciais para evitar a propagação de surtos ou transmissão horizontal de isolados em ambientes hospitalares.

6. CONCLUSÃO

- A maioria dos pacientes avaliados neste estudo eram mulheres idosas, apresentando comorbidades como nefropatia, e haviam utilizado dispositivos invasivos, especialmente CVC e SNG/SNE. A maioria também recebeu tratamento prévio com antibióticos, destacando-se o uso de glicopeptídeos, polimixina B e piperacilina/tazobactam. Esses pacientes permaneceram internados por mais de 30 dias, e dos 9 avaliados, 8 não sobreviveram;
- Em relação ao ensaio fenotípico de produção de biofilme, todos os isolados de *A. baumannii* testados demonstraram capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada e apresentam número considerável de células viáveis após 24 horas de incubação, independente do perfil de resistência;
- Dois isolados foram classificados como moderados produtores de biofilme, 2 foram considerados produtores fracos, e 5 isolados não-produtores de biofilme;

- Todas as cepas foram classificadas como MDR e carregavam o gene *bla*_{OXA-51}, enquanto 66,7% apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}, responsável pela codificação da principal carbapenemase presente em *A. baumannii*;
- Em relação à presença dos genes de virulência, observou-se que os genes *plcD*, *bfmS*, *csuE*, *adeH*, *pgaA*, *basG* e *basJ* estavam presentes em 100% das cepas avaliadas neste estudo;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre a formação de biofilme e a presença ou ausência dos genes de virulência testados;
- Dos resultados obtidos através da técnica de PFGE, observou-se uma diversidade clonal, com a prevalência e disseminação de quatro pulsotipos distintos (A-D), juntamente com a identificação dos clones A e B.
- Exceto pela associação observada entre o pulsotipo A e o perfil de resistência das duas cepas avaliadas, a análise da relação entre a tipagem pelo PFGE e os perfis de resistência aos antibióticos não evidenciou uma conexão direta entre esses padrões e os outros pulsotipos identificados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, N. A. et al. In Silico Docking, Resistance Modulation and Biofilm Gene Expression in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* via Cinnamic and Gallic Acids. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 870, 2022. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070870/S1>

ALRAHMANY, D. et al. *Acinetobacter baumannii* Infection-Related Mortality in Hospitalized Patients: Risk Factors and Potential Targets for Clinical and Antimicrobial Stewardship Interventions. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081086>

AMADOR, C. I. et al. High-throughput screening alternative to crystal violet biofilm assay combining fluorescence quantification and imaging. **Journal of Microbiological Methods**, v. 190, p. 106343, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106343>

APPANEAL, H. J. et al. Treatment, Clinical Outcomes, and Predictors of Mortality among a National Cohort of Admitted Patients with *Acinetobacter baumannii* Infection. **Epidemiology and surveillance**, v.66, n.3, e0197521, p.1-10, 2022. <https://journals.asm.org/journal/aac>

AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

BADAVE, G. K.; DHANANJAY, K. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 1, p. DC08-DC10, 2015. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

BENAISSA, E. et al. Risk factors for acquiring *Acinetobacter baumannii* infection in the intensive care unit: experience from a Moroccan hospital. **Access Microbiology**, v. 5, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000637.V3>

CASTILHO, S. R. A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PloS one**, v. 12, n. 5, 2017. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176790>

CAVALCANTE, E. F. DE O. et al. Implementation of patient safety centers and the healthcare-associated infections: **Online Revista Gaúcha de Enfermagem** (n.d.). <https://doi.org/10.1590/1983>

CHOUDHARY, M. et al. Decoding *Acinetobacter baumannii* biofilm dynamics and associated protein markers: proteomic and bioinformatics approach. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 4, p. 1–13, 2022. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-02807-Y/METRICS>

COLQUHOUN, J. M.; RATHER, P. N. Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 253, 2020. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00253/FULL>

CONDE-PÉREZ, K. et al. In-Depth Analysis of the Role of the Acinetobactin Cluster in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 752070, 5 out. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752070>

COOK-LIBIN, S. et al. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*. Infection and Immunity. **American Society for Microbiology**, 2022. <https://doi.org/10.1128/iai.00223-22>

DA SILVA, K. E. et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA₂₃ in a Brazilian intensive care unit. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2018. [10.1371/journal.pone.0209367](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209367)

DE BREIJ, A. et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 213–218, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2009.01.002>

DE FREITAS, S. B. et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated with Nosocomial Infection in the Pelotas, RS, Brazil. **Current Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 2724–2734, 2020. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02060-W/METRICS>

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, dez. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>

DOLMA, K. G. et al. Virulence Characteristics and Emerging Therapies for Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii*: A Review. **Biology**, v. 11, n. 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11091343>

DUARTE, A. et al. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 45, p. 29–33, 2016.

<https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2016.02.002>

EZE, E. C.; EL ZOWALATY, M. E.; PILLAY, M. Antibiotic resistance and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from high-risk effluent water in tertiary hospitals in South Africa. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 82–90, 2021.

<https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.08.004>

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: No longer a controversial issue. **Critical Care**, v. 11, n. 4, 2007. <https://doi.org/10.1186/cc5911>

FITZSIMONS, T. C. et al. Identification of novel *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system antibacterial effector and immunity pairs. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, 2018.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00297-18>

GelAnalyzer 23.1. Available at: www.gelanalyzer.com. Accessed [21 set. 2023]. Developed by Istvan Lazar Jr., PhD, and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc.

GHARAIBEH, M. H. et al. Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii*: Phenotypic and Genotypic Resistance Profiles and the Associated Risk Factors in Teaching Hospital in Jordan. **Journal of infection and public health**, v. 17, n. 4, p. 543–550, 2024.

<https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2024.01.018>

HARDING, C. M. et al. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 22, p. 9075–9087, 2017. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.781575>

HASAN, T.; CHOI, C. H.; OH, M. H. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. **Genomics & informatics**, v. 13, n. 1, p. 2, 2015. <https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.1.2>

HU, Y. Y. et al. Regulation of gene expression of *hcp*, a core gene of the type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii* causing respiratory tract infection. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 7, p. 945–951, 2018. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000753>

JACOBS, A. C. et al. Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1952, 2010. <https://doi.org/10.1128/iai.00889-09>

JEAN, S. S.; HARNOD, D.; HSUEH, P. R. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 5 mar. 2022. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.823684>

KHOSHNOOD, S. et al. Antimicrobial resistance and biofilm formation capacity among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with burns and ventilator-associated pneumonia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 37, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1002/JCLA.24814>

KIM, J. et al. Microbiological features and clinical impact of the type VI secretion system (T6SS) in *Acinetobacter baumannii* isolates causing bacteremia. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1378–1389, 2017. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1323164>

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **diagnóstico microbiológico**. 5.ed., rio de janeiro: medsi, 2001. 1465p

KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, v. 10, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030373>

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00055>

LI, Z. et al. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2613, 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S310081>

LIN, M.-F.; LAN, C.-Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases : WJCC**, v. 2, n. 12, p. 787, 2014. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V2.I12.787>

LIYOU, M. L. et al. The sensor kinase *BfmS* mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 4, p. 275–281, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2012.12.004>

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **The New Microbiologica**, v. 37, n. 2, p. 119–127, 1 abr. 2014.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>

MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126722, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2021.126722>

MENDES, S. G. et al. Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from mechanisms to therapeutic strategies. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 12, p. 1405, 2023.

MOHAMMADI BARDBARI, A. et al. Molecular typing of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from clinical and environmental specimens in three Iranian hospitals by pulsed field gel electrophoresis. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.

<https://doi.org/10.1186/S12866-020-01792-W>

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen.

AntibioticsMDPI AG, , 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>

NEOH, H. MIN et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 74, 2019.

<https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.103935>

NOVOVIC, K. et al. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0122793>

OMMEN, P.; ZOBK, N.; MEYER, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of microbiological methods**, v. 141, p. 87–89, 2017.

<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.08.003>

PAZOKI, M. et al. Immunoprotectivity of Valine-glycine repeat protein G, a potent mediator of pathogenicity, against *Acinetobacter baumannii*. **Molecular immunology**, v. 135, p. 276–284, 2021.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2021.04.026>

PEREZ MORA, B. et al. BfmRS encodes a regulatory system involved in light signal transduction modulating motility and desiccation tolerance in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023. [10.1038/s41598-022-26314-8](https://doi.org/10.1038/s41598-022-26314-8)

RAMIREZ, M. S.; BONOMO, R. A.; TOLMASKY, M. E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, 2020. <https://doi.org/10.3390/BIOM10050720>

REPIZO, G. D. et al. Bioinformatic Analysis of the Type VI Secretion System and Its Potential Toxins in the *Acinetobacter* Genus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 457539, 2019. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02519/BIBTEX>

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. **Archives of internal medicine**, v. 168, n. 17, p. 1897–1902, 2008. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.168.17.1897>

ROSSI, I. et al. Incidence of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **American journal of infection control**, v. 47, n. 12, p. 1431–1435, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2019.07.009>

ROY, S. et al. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 793615, 2022. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.793615/BIBTEX>

ROYER, S. et al. 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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 350–357, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1016%2Fj.bjid.2015.03.009>

ROYER, S. et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla_{OXA-23}* producing XDR *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198643, 2018.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198643>

SANCHEZ, C. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-47/TABLES/3>

SAXENA, S. et al. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 8, n. 5, p. DC09, 2014. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7808.4330>

SERRA-BURRIEL, M. et al. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis.

PloS one, v. 15, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227139>

SHADAN, A. et al. Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Frontiers Media S.A.**, , 2023. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1053968>

SHAN, W. et al. Insights into mucoid *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological characteristics, virulence, and pathogenic mechanisms in a threatening nosocomial pathogen.

Microbiological Research, v. 261, p. 127057, 2022.

<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127057>

SHARMA, S. et al. Susceptibility profile of *bla_{OXA-23}* and metallo- β -lactamases co-harboring isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) against standard drugs and combinations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1068840, 2023.

<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1068840/BIBTEX>

SHELDON, J. R.; SKAAR, E. P. *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, 2020. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008995>

SILVA, E. C. et al. Characterization of *Salmonella* Isolates from Bullfrog Production Chain: Antimicrobial Resistance, MIST, and PFGE Analysis Rochester, NY, 7 mar.2024. <https://doi.org/10.2139/SSRN.4742707>

STAHL, J. et al. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138360, 2015. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138360>

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233, 1995. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995>

TOMARAS, A. P. et al. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3398–3409, 2008. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/019471-0>

TRENTIN, D. S. et al. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013. <https://revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/229>

UPMANYU, K.; HAQ, Q. M. R.; SINGH, R. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100131, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2022.100131>

VUOTTO, C. et al. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743, 5 set. 2014. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS3030743>

WEBER, B. S. et al. The Secrets of *Acinetobacter* Secretion. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 7, p. 532–545, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.01.005>

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351–353, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2006.01.004>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017. <https://iris.who.int/handle/10665/311820>

YANG, C. H. et al. Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, 2019. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24101849>

YOON, E. J. et al. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00309-15>

ZEIGHAMI, H. et al. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1186/S12879-019-4272-0/TABLES/7>

ZHU, Y. et al. Insight into carbapenem resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii* from a children's medical centre in eastern China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 21, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/S12941-022-00536-0>

8. ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação epidemiológica e detecção molecular de fatores de virulência em isolados de *Acinetobacter baumannii* recuperados de amostras clínicas de sangue e pulmão

Pesquisador: Sabrina Royer

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 68181322.6.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 25 de Setembro de 2023

Assinado por:
ALEANDRA DA SILVA FIGUEIRA SAMPAIO
(Coordenador(a))