



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE
BIONORTE



**DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE PATÓGENOS EMERGENTES
ISOLADOS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E ANÁLISE DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE VACINA COMPOSTA DE ANTÍGENO INATIVADO DE
Acinetobacter baumannii ADSORVIDO EM ADJUVANTE A BASE DE QUITOSANA
AVALIADOS EM MODELOS MURINOS**

TÚLLIO TEIXEIRA DEUSDARÁ

GURUPI – TO

2023

TÚLLIO TEIXEIRA DEUSDARÁ

**DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE PATÓGENOS EMERGENTES
ISOLADOS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E ANÁLISE DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE VACINA COMPOSTA DE ANTÍGENO INATIVADO DE
Acinetobacter baumannii ADSORVIDO EM ADJUVANTE A BASE DE QUITOSANA
AVALIADOS EM MODELOS MURINOS**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu

GURUPI – TO

JUNHO/2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D436d Deusdará, Túlio Teixeira.

Determinantes de resistência de patógenos emergentes isolados de unidade de terapia intensiva e análise da resposta imunológica de vacina composta de antígeno inativado de *Acinetobacter baumannii* adsorvido em adjuvante a base de quitosana avaliados em modelos murinos. : 1. Capítulo I - Determinantes de resistência a patógenos emergentes isolados de uma unidade de terapia intensiva como parâmetro das condições de saúde da população da microrregião da Amazônia legal. 2. Capítulo II - O uso de uma matriz de hidróxido de alumínio-quitosana aumentou o potencial da vacina e a resposta imune de camundongos contra o *Acinetobacter baumannii* multiresistente a drogas. / Túlio Teixeira Deusdará. – Palmas, TO, 2023.

125 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2023.

Orientador: Alex Sander Rodrigues Cangussu

1. Infecções nosocomiais. 2. Identificação microbiana. 3. *Acinetobacter baumannii*. 4. Vacina. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

TÚLLIO TEIXEIRA DEUSDARÁ

**DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE PATÓGENOS EMERGENTES
ISOLADOS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E ANÁLISE DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE VACINA COMPOSTA DE ANTÍGENO INATIVADO DE
Acinetobacter baumannii ADSORVIDO EM ADJUVANTE A BASE DE QUITOSANA
AVALIADOS EM MODELOS MURINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins - TO, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovado em 02/06/2023.

Orientador - Presidente da Banca examinadora

Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu

Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Membros Titulares:

Prof. Dr.(a) Paula Benevides de Moraes

Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Prof. Dr.(a) Maria Cristina Pranchevicius

Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

Prof. Dr.(a) Vanessa Mara Chapla

Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Prof. Dr. Igor Viana Brandi

Instituto de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG)

TÚLLIO TEIXEIRA DEUSDARÁ**DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE PATÓGENOS EMERGENTES
ISOLADOS DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E ANÁLISE DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE VACINA COMPOSTA DE ANTÍGENO
INATIVADO DE *Acinetobacter baumannii* ADSORVIDO EM ADJUVANTE A
BASE DE QUITOSANA AVALIADOS EM MODELOS MURINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins - TO, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovado em 02/06/2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU
Data: 28/08/2023 15:34:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu
(Orientador) Universidade Federal do Tocantins (UFT).



Documento assinado digitalmente
PAULA BENEVIDES DE MORAIS
Data: 01/09/2023 08:58:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.(a) Paula Benevides de
Morais
Universidade Federal do Tocantins (UFT).



Documento assinado digitalmente
MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS
Data: 28/08/2023 11:20:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.(a) Maria Cristina Pranchevicius
Universidade Federal de São Carlos
(UFSCAR).



Documento assinado digitalmente
VANESSA MARA CHAPLA
Data: 28/08/2023 13:41:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.(a) Vanessa Mara Chapla
Universidade Federal do Tocantins (UFT).



Documento assinado digitalmente
IGOR VIANA BRANDI
Data: 28/08/2023 12:14:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Igor Viana Brandi
Instituto de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG)

DEDICATÓRIA

Dedico,

A Deus:

Por ter me dado a capacidade para desenvolver este trabalho.

À minha família:

Que é graças aos seus esforços hoje posso concluir mais uma etapa.

As minhas queridas, esposa Loren, e filha Sarah:

Que por tantas vezes com sabedoria e paciência me deram forças para alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me abençoou grandemente tudo na minha vida e permitiu que alcançasse o tão sonhado título de Doutor.

A Toda minha família, que sempre me apoiou nas decisões tomadas, mesmo diante de tantas dificuldades, foram essenciais na minha formação acadêmica e profissional. Amo todos!

À Loren Caroline Terencio Teixeira, companheira da vida toda, já passamos por muitas provações e hoje posso compartilhar essa conquista com você, te amo para sempre.

A Sarah Terencio Teixeira, minha filha linda, sei que às vezes erro por excesso de zelo, mas meu coração sempre tem as melhores intenções, pois amo mais que tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alex Sander Rodriguês Cangussu, pelos ensinamentos, dedicação e comprometimento com a pesquisa.

À Universidade Federal do Tocantins, que por meio do programa de qualificação de servidor possibilitou alcançar mais essa conquista.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, que contribuíram na minha formação acadêmica. Obrigado pelo conhecimento transmitido na sala de aula e no laboratório.

Ao Professor Marcos Gontijo, pelo auxílio e colaboração nas análises histopatológicas.

A Equipe do Departamento de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazonia, pelo apoio técnico-operacional constante e essencial na execução deste trabalho.

Ao Técnico em Histologia Benedito Albuquerque, pela colaboração e auxílio na realização de procedimentos técnico-laboratoriais desta pesquisa.

A Equipe do Departamento de Microbiologia do Laboratório Médico LABNORT e Instituto HERMES PARDINI pelo apoio técnico nas análises microbiológicas.

A Todos do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biomolécula e Vacinas (LabVac-UFT), em especial Josian Rocha, Wadylla Carvalho, Mellanie Felix, Benedito Albuquerque e Hélio Brito e aos demais que de forma direta ou indiretamente contribuí durante a fase experimental, e por muitos momentos de companheirismo e amizade.

Ao LACEN-TO, por ceder o isolado bacteriano utilizado neste trabalho.

Ao Governo do Estado (FAPT) sempre incentivando e financiando a ciência por meio de editais nas diversas áreas de conhecimento, e assim permitiu recursos para adquirir equipamentos e insumos para desenvolvimento deste trabalho (PPSUS/2018).

À banca examinadora pelas contribuições finais para a concretização e melhoramento desse trabalho.

EPÍGRAFE

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

Sócrates

Deusdará, Túllio Teixeira. **Determinantes de resistência de patógenos emergentes isolados de unidade de terapia intensiva e análise da resposta imunológica de vacina composta de antígeno inativado de *Acinetobacter baumannii* adsorvido em adjuvante a base de quitosana avaliados em modelos murinos.** 125 folhas. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Brasil, 2023.

RESUMO

As bactérias patogênicas são comumente encontradas em ambiente hospitalar, água, solo e produtos alimentícios. São responsáveis por causar morbimortalidade, principalmente de indivíduos imunossuprimidos. O risco de infecções é intensificado devido a capacidade de adquirir resistência a múltiplos antibióticos (MDR), especialmente da classe dos β -lactâmicos, e por persistirem em diversas superfícies por longos períodos. Nesse trabalho, avaliou-se em um primeiro momento caracterização fenotípica e genotípica de isolados bacterianos de leitos de unidade de terapia intensiva (UTI). A técnica MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA foi utilizada para identificação dos isolados bacterianos. A identificação microbiana resultou na identificação de *Sphingomonas paucimobilis* (ILH.14), *Bacillus circulans* (ILH.16), *Bacillus subtilis* (ILH.11), *Bacillus cereus* (ILH.13), *Bacillus licheniformis* (ILH.2) e *Acinetobacter schindleri* (ILH.10). Assim, esta primeira parte contribuiu na identificação de isolados microrganismos presente em UTI's que podem direcionar em melhoria de protocolos para atendimento de serviços de prestação à saúde, possibilitando também em adoção de políticas publica voltadas a melhorias da qualidade de vida, minimizando infecções hospitalares. Na segunda parte desta pesquisa focamos na avaliação de uma prova de conceito para avaliar a imunogenicidade de uma vacina de células inteira inativada de *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) em camundongos tratados com ciclofosfamida e posterior desafio com cepa ativa. Nessa segunda parte do trabalho observou-se que camundongos imunizados foram capazes de induzir resposta humoral significativa, constituindo os maiores níveis de IgG encontrados, além de maior taxa de sobrevivência, 85%, diferindo de camundongos não imunizados (Controle), sem nenhum sobrevivente ($p<0,001$), e adjuvante com 45% de sobrevivência ($p<0,05$). Além disso foi possível confirmar que esta prova de conceito mostrou uma forte resposta imunológica, com proteção vacinal no modelo proposto contribuindo para o avanço de novas alternativas para proteção contra infecções *A. baumannii*.

Keywords: Infecções hospitalar; *A.baumannii*; Vacina; Identificação microbiana.

Deusdará, Túllio Teixeira. **Resistance determinants of emerging pathogens isolated from the intensive care unit and analysis of the immune response of a vaccine composed of an inactivated *Acinetobacter baumannii* antigen adsorbed in chitosan-based adjuvant evaluated in murine models.** 125 pages. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Tocantins, Gurupi-TO, Brazil, 2023.

ABSTRACT

Pathogenic bacteria are commonly found in hospitals, water, soil, and food products. They are responsible for causing morbidity and mortality, primarily in immunosuppressed individuals. The risk of infections is intensified due to their ability to acquire multidrug resistance (MDR) to antibiotics, especially β -lactams, which persist on various surfaces for long periods. In this study, we performed phenotypic and genotypic characterization of bacterial isolates from intensive care unit (ICU) beds. We used MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing to identify bacterial isolates. The microbial identification resulted in the identification of *Sphingomonas paucimobilis* (ILH.14), *Bacillus circulans* (ILH.16), *Bacillus subtilis* (ILH.11), *Bacillus cereus* (ILH.13), *Bacillus licheniformis* (ILH.2), and *Acinetobacter schindleri* (ILH.10). Thus, this first part contributed to the identification of isolated microorganisms present in ICUs that can direct the improvement of protocols for attending health services, also enabling the adoption of public policies aimed at improving the quality of life, minimizing hospital infections. Then, we performed a proof of concept study to evaluate the immunogenicity of an inactivated whole-cell vaccine against *Acinetobacter baumannii* in mice treated with cyclophosphamide and subsequently challenged with an active strain. In this second part, immunized mice generated a significant humoral response. This group showed the highest immunoglobulin G levels and the highest survival rate (85%), differing from the non-immunized control group, which had no survivors ($p<0.001$), and the adjuvant group with 45% survival ($p<0.05$). This proof of concept study demonstrated a robust immune response with vaccine protection in the proposed model contributing to developing alternatives for protection against *A. baumannii* infections.

Keywords: Hospital infections; *A. baumannii*; Vaccine; Microbial identification.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1 - Descrição técnica de MALDI-TOF MS.....	24
Figura 2 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos em bactéria, e efeitos e os locais onde atuam.....	27
Figura 3 - Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos.....	28
Figura 4 - Epidemiologia de infecções por <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenem. O tom de azul representa o nível de resistência aos carbapenêmicos em todo o mundo durante a última década (2009-2018).....	32
Tabela 1 - Resistência aos antibióticos em <i>Acinetobacter</i> spp. realizados por SENTRY (2001-2010).....	32
Figura 5 - Esquema metodológico do trabalho de tese.....	37

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Genes-alvo para amplificação por PCR, tamanho do fragmento e sequências de primers.....	57
Tabela 2 - Caracterização fenotípica de isolados de leitos de UTI hospitalar no Tocantins, Brasil.....	59
Figura 1 - Taxas antimicrobianas de resistência bacteriana isoladas de leitos hospitalares de UTI (n = 56).....	60
Tabela 3 - Resistência antimicrobiana de isolados e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	61
Tabela 4 - Resistência antimicrobiana de isolados e identificação microbiana por MALDI-TOF MS.....	61
Figura 2 - Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança das sequências do gene 16S rRNA (400 pb) do isolado ILH10 com identificação de depósito no GenBank ON853562.1 (seta preta). Isolado ILH13 com identificação de depósito no GenBank ON853564.1 (seta preta). Isolado ILH2 com identificação de depósito no GenBank ON853570.1 (seta preta). Os valores de bootstrap são indicados na raiz de cada ramificação.....	62
Figura 3 - Espectrômetro de massa com o perfil proteômico do isolado ILH16 (<i>B. circulans</i>) por MALDI-TOF MS.....	63

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Determinação da dose letal de <i>A. baumannii</i> em camundongos não tratados com CY	81
Figura 2 - Determinação do número de doses de mAhC em camundongos não tratados com CY.....	82
Tabela 1 - O modelo alvo do lipopolissacarídeo de <i>A. baumannii</i> foi utilizado para analisar o acoplamento molecular com quitosana.....	83
Tabela 2 - Resultados do acoplamento molecular para complexos entre a quitosana e o alvo de <i>A. baumannii</i>	83
Figura 3 - Cálculos de acoplamento molecular.....	84
Figura 4 - Descrição do modelo imunossupressor de camundongos Swiss.....	84
Figura 5 - Estimulação da resposta humoral da vacina inativada de células inteiras de <i>A. baumannii</i> adsorvida em mAhC em camundongos tratados com CY.....	85
Figura 6 - Teste de eficiência da vacina de célula inteira inativada e adsorvida em mAhC em camundongos tratados com CY.....	86
Figura 7 - Achados histopatológicos da infecção por <i>A. baumannii</i> em camundongos tratados com CY.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDR	Multi-Drogas Resistentes
XDR	Extensivamente Drogas Resistentes
PDR	Pan Drogas Resistentes
IRAS	Infecções Associadas a Assistência à Saúde
HRG	Hospital Regional de Gurupi
UTI	Unidades de Terapias Intensiva
PAV	Pneumonia Associadas à Ventilação Mecânica
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossômico
PABA	Ácido Paraaminobenzóico
DHF	Dihidrofolato
THF	Tetrahidrofolato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA_m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNA_t	Ácido Ribonucleico Transportador
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
MALDI-TOF	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo
MS	Espectrometria de massa
LPS	Lipopolissacarídeos
SENTRY	Programa de Vigilância Antimicrobiana
BrSCOPE	Vigilância e Controle Brasileiro de Patógenos de Importância Epidemiológica
OMVs	Vesículas de Membrana Externa
OmpA	Proteína de Membrana Externa A
ESβL	β-lactamases de Espectro Estendido
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
OXA	Oxacilinas
SI	Elemento de inserção
GNB	Gram-negativos
PRRs	Receptor de reconhecimento de padrão
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
Th	Linfócitos T auxiliar

IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
CY	Ciclofosfamida
LaBVac	Laboratório de Biomoléculas e Vacinas
CFU	Unidade Formadora de Colônia
UFT	Universidade Federal do Tocantins
mAhC	Matriz Hidróxido de Alumínio-Quitossana
nm	Nanômetro
h	hora
μl	Microlitro
v/v	volume/volume
w/w	peso/peso
mg	miligrama
g	grama
Kg	kilograma
PBS	Tampão fosfato salino
mL	Mililitro
RPM	Rotação Por Minuto
OD	Densidade Óptica
PH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	21
3.1 INFECÇÕES EM AMBIENTE HOSPITALAR.....	21
3.2 <i>Acinetobacter</i> spp.....	22
3.2.1 Características do gênero <i>Acinetobacter</i> spp.....	22
3.2.2 Identificação bacteriana.....	22
3.2.3 Importância clínica e fatores de virulência de <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICOS	27
3.3.1 Antibióticos β -lactâmicos.....	27
3.3.2 Resistência aos β -lactâmicos.....	28
3.3.3 Resistência aos carbapenêmicos.....	30
3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS	32
3.4.1 Resposta imunológica contra infecção de bactéria extracelular.....	32
3.4.2 Avaliação de formulações vacinais em modelos murinos.....	34
3.5 JUSTIFICATIVA.....	35
3.6 FLUXO METODOLÓGICO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO I - DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS EMERGENTES ISOLADOS DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA COMO PARÂMETRO DAS CONDIÇÕES DE SAÚDE DA POPULAÇÃO DA MICRORREGIÃO DA AMAZÔNIA LEGAL	52
ABSTRACT.....	52
RESUMO.....	53
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1 LOCAL DO ESTUDO; PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS; PERMISSÕES ÉTICAS E LEGAIS.....	55
2.2 ANÁLISE FENOTÍPICA E CLASSIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	56
2.3 ANÁLISE MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES.....	56
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS EMERGENTES.....	57
2.4.1 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	57
2.4.2 Identificação por MALDI-TOF MS.....	58
3. RESULTADOS.....	58
3.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, TESTE DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	58
3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA USANDO 16S rRNA E MALDI-TOF MS.....	59
4. DISCUSSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	66
CAPÍTULO II - O USO DE UMA MATRIZ DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO-QUITOSANA AUMENTOU O POTENCIAL DA VACINA E A RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS CONTRA O <i>Acinetobacter baumannii</i> MULTIRESISTENTES A DROGAS.....	73
ABSTRACT.....	73
RESUMO.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
2.1 CEPA <i>A. baumannii</i> E DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL.....	76

2.2	INATIVAÇÃO DA CULTURA DE <i>A. baumannii</i>	77
2.3	mAhC E FORMULAÇÃO VACINAL.....	77
2.4	mAhC E CÁLCULOS ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	77
2.5	REQUERIMENTOS ÉTICOS/LEGAIS E USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTO.....	78
2.6	DESENHO EXPERIMENTAL.....	79
2.7	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) USANDO CULTURA DE <i>A. baumannii</i>	79
2.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	80
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
3.	RESULTADOS	81
3.1	MODELO DE INFECÇÃO DE SEPSE USANDO <i>A. baumannii</i> EM CAMUNDONGOS NÃO TRATADOS COM CY.....	81
3.2	DETERMINAÇÃO DA DOSE DE mAhC EM CAMUNDONGOS NÃO TRATADOS COM CY.....	82
3.3	ACOPLAMENTO MOLECULAR DE mAhC E LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO.....	82
3.4	MODELO IMUNOSSUPRESSOR.....	83
3.5	EFEITO PROTETOR DA VACINA DE CÉLULAS INTEIRAS DE <i>A. baumannii</i> INATIVADA E ADSORVIDA EM mAhC EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM CY.....	85
3.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO MODELO DE SEPSE DA INFECÇÃO POR <i>A. baumannii</i> EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM CY.....	87
4.	DISCUSSÃO	88
5.	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	91
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	ANEXO A. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFT...98	
	ANEXO B. ISOLADO CLÍNICO DE <i>A. baumannii</i> FORNECIDO PELO LACEN-TO.....99	
	ANEXO C. ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES A TESE.....100	

1. INTRODUÇÃO GERAL

As infecções nosocomiais causadas por bactérias têm se tornado um grande problema de saúde pública. *A. baumannii* é um patógeno extracelular gram-negativo que está envolvido com infecções como pneumonia, septicemia, infecção urinária e meningite e contribui com cerca de 17% de todas as infecções nosocomiais, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (NTUSI et al., 2012; ALMASAUD et al., 2018; MUNIER et al., 2019). *A. baumannii* possui uma habilidade de sobrevivência em uma variedade de condições ambientais e persiste por longos períodos em superfícies; além disso, são capazes de adquirir resistência a múltiplas drogas (MDR), incluindo os carbapenêmicos, que são comumente usados no tratamento de último recurso para infecções bacterianas MDR, podendo, assim, provocar surtos de infecções hospitalares (KIFFER et al., 2003; FOURNIER e RICHET, 2006; VIEIRA e PICOLI, 2015; ALMASAUD et al., 2018).

Ações urgentes são necessárias para reforçar o conjunto de drogas existentes, como novos antibióticos para evitar a disseminação de bactérias resistentes a múltiplas drogas. *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, resistentes a carbapenem foram listadas pela Organização Mundial da Saúde como patógenos de prioridade crítica (WHO, 2017). No entanto, não houve muitos avanços nas descobertas de novos antibióticos para suprir estas necessidades, já que os novos antibióticos estarão sujeitos ao processo de adaptação por meio da pressão seletiva responsáveis pelo surgimento de patógenos MDR (MA e CHEN et al., 2021). Então, abordagens alternativas devem ser exploradas para o tratamento, de modo que o desenvolvimento de vacinas eficazes tornou-se uma prioridade para saúde e uma alternativa para combater diversos patógenos causadores de infecções nosocomiais, pois não há indução de resistência e reduz o uso de antimicrobianos (SHU et al., 2016).

O desenvolvimento de vacinas para *A. baumannii* é promissor e desafiador, sendo capaz de gerar um grande impacto no manejo clínico das infecções causadas por este patógeno, porém, até o momento, apresenta avanço substancial quando comparado a outras vacinas de patógenos MDR nosocomiais, como o *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (REDI et al., 2018; RILEY et al., 2019; MA e CHEN et al., 2021). Diversos estudos com diferentes abordagens foram utilizados para o desenvolvimento de vacinas e demonstraram capacidade de estimular respostas imunes resistentes e protetoras, que incluem vacinas de células bacterianas inativas e atenuadas (BILLIPS et al. 2009; ZAIDI et al. 2006; McCONNELL e PACHÓN, 2011; SHU et al., 2016; MA e CHEN et al., 2021).

As vacinas de células inteiras de *A. baumannii* podem estimular uma resposta contra diversos antígenos, sendo importante para fornecer proteção contra uma extensa gama de cepas

dentro de uma espécie bacteriana (McCONNELL e PACHÓN, 2011; SHU et al., 2016).

Nos últimos anos, a incidência de infecção nosocomial causada por *A. baumannii* MDR aumentou consideravelmente no Brasil e no mundo (SAALFELD et al., 2009; BRAGA et al., 2018; KURIHARA et al., 2022), principalmente em pacientes imunocomprometidos, considerados como um quadro clínico de alta gravidade (NTUSI et al., 2012; SILVA et al., 2018; COSTA et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Diante deste exposto e com a preocupação de identificar MDR's presentes em ambiente hospitalar e propor uma alternativa profilática, dividimos esta tese em dois capítulos. No Cap. I, o isolamento e a identificação por meio de técnica molecular, perfis proteômicos por MALDI-TOF MS e de testes de susceptibilidade a antibióticos de bactérias isoladas de leitos hospitalar. Cap. II, o desenvolvimento de uma vacina de células inteiras inativadas de *A. baumannii* adsorvida em matriz de quitosana e hidróxido de alumínio que visa minimizar o emprego de antimicrobianos no controle de infecções de MDR pela indução e o fortalecimento do sistema imune de hospedeiros imunocomprometidos. É uma prova de conceito para análise dos mecanismos de resposta imunológica em modelos murinos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivos identificar por MALDI-TOF MS e sequenciamento do gene 16S rRNA e caracterizar a susceptibilidade a antibiótico de isolados bacterianos de superfície de cama de pacientes hospitalizados em UTI de Hospital Regional do Estado do Tocantins (UTI/HRG-TO), bem como verificar a resposta imunológica de uma vacina composta de antígeno inativado *A. baumannii* adsorvida em matriz de hidróxido de alumínio-quitosana em camundongos Swiss.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- i) Coletar amostras de leitos de UTI hospitalar;
- ii) Isolar e caracterizar bactérias quanto à susceptibilidade antimicrobianos;
- iii) Identificar por métodos moleculares e MALDI TOF-MS;
- iv) Estabelecer e monitorar a imunossupressão de camundongos Swiss com ciclofosfamida;
- v) Determinar dose letal de *A. Baumannii* em camundongos Swiss;
- vi) Produzir antígeno vacinal inativado de *A. Baumannii*;
- vii) Padronizar adjuvante *mAhC* para formulação vacinal;
- viii) Validar modelos in-silico do complexo *mAhC* e LPS bacteriano;
- ix) Imunizar grupos experimentais de camundongos Swiss imunossuprimidos;
- x) Avaliar a eficácia vacinal de camundongos Swiss, por meio de um desafio com patógeno ativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INFECÇÕES EM AMBIENTE HOSPITALAR

As infecções associadas a assistência à saúde (IRAS) ou infecções nosocomiais são infecções adquiridas em ambiente hospitalar ou em outra unidade de saúde após a internação do paciente sob cuidados médicos, as quais manifestam durante a internação ou mesmo após alta hospitalar, estas quando associadas a internação ou procedimentos hospitalares (HAQUE et al., 2018; LIU e DICKTER, 2020). São consideradas um grave problema de saúde pública e apresentam impactos negativos nos sistemas de saúde em diversos países, pois são responsáveis pelo aumento no tempo de hospitalização e, consequentemente, elevados custos adicionais para o tratamento do doente (LIU e DICKTER, 2020).

No Brasil, as IRAS são motivo de preocupação. Dados revelam que a prevalência em UTI representa cerca de 61%, bem como alta taxa de mortalidade dos pacientes que podem chegar a 40%. Além do mais, são de cinco a dez vezes maiores de adquirir infecções do que em outras unidades de internação hospitalar (SILVA et al., 2012; REINALDO et al., 2017). As infecções nosocomiais mais frequentes e com alta taxa de incidência de morte são: corrente sanguínea associadas a cateter central; infecção urinária associada a cateter; infecções do trato respiratório e infecções do sítio cirúrgico (KHAN et al., 2017).

Os patógenos frequentemente associados as infecções nosocomiais são bactérias, vírus e fungos. Alguns microrganismos pertencem à flora natural dos indivíduos e podem causar infecções somente quando o sistema imunológico encontra-se debilitado e consequentemente susceptível as infecções. Além disso, as instalações médicas, dispositivos invasivos, água e alimentos são fontes de transmissão de patógenos (KHAN et al., 2017; KOLLEF et al. 2021).

As bactérias mais comuns responsáveis por infecções hospitalares são *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Enterococcus* sp., e *Enterobacter* sp. (SMET et al., 2014; FERREIRA et al., 2019; ARBAB et al., 2021). As espécies do gênero *Acinetobacter* estão amplamente distribuídas em diferentes ambientes como materiais inanimados e reservatórios humanos. A prevalência desta bactéria em ambientes hospitalares, mais precisamente na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), corresponde a 80% das infecções relatadas (SADEGHIFARD et al., 2010; JOSHI e LITAKE, 2013).

A espécie *A. baumannii* é a mais importante representante do gênero *Acinetobacter*, pois é capaz de adquirir resistência a antimicrobiano, comumente utilizado na prática clínica e, consequentemente, causar surtos hospitalares, como pneumonia associadas à ventilação

mecânica (PAV), meningite, bacteremia, infecções do trato urinário e de sítios cirúrgicos (ESPINAL et al., 2012; HOU e YANG, 2015; CHAKRAVARTY, 2020).

3.2 *Acinetobacter* spp.

3.2.1 Característica do gênero *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter foi descrito pela primeira vez em 1911 como *Micrococcus calcoaceticus*, passando a ser conhecido como *Acinetobacter* a partir de 1950 (BEIJERINCK, 1911; BAUMANN et al., 1968). Inicialmente, foi considerado como um representante da família *Neisseriaceae*, mas, atualmente, está inserido na família *Moraxellaceae*, ordem *Pseudomonales*, classe *Gammaproteobacteria*, filo *Proteobacteria*. Caracteriza-se por ser uma bactéria em forma cocobacilo, gram-negativa, não fermentadora, não formadora de esporos, imóvel, aeróbia, que emergiu de um organismo de patogenicidade questionável para um agente infeccioso de importância nas últimas décadas (FOURNIER et al., 2006; PELEG et al., 2008; BENNETT et al., 2019; IBRAHIM et al., 2021; FONSECA et al., 2021).

Os habitats naturais de microrganismos deste gênero são água e solo, mas podem ser isolados de alimentos, artrópodes e meio ambiente (GETCHELL-WHITE et al., 1989; RAHAL e URBAN, 2000). Em humanos, a *Acinetobacter* pode colonizar a pele, feridas e o trato respiratório e gastrointestinal (JAIN e DANZIGER, 2004; FOURNIER et al., 2006). Algumas cepas podem sobreviver à dessecação ambiental por semanas, uma característica que promove sua transmissão por contaminação (CATALANO et al., 1999; PELEG et al., 2008;).

As espécies mais relevantes deste gênero pertencem ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb), quais sejam, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. dijksboorniae* e *A. calcoaceticus* (TOUCHON et al., 2014). Há uma grande similaridade fenotípica entre as espécies deste complexo; certo de que a identificação e a distinção *A. baumannii*, espécie de maior importância clínica, são limitadas (NEMEC et al., 2011, COSGAYA et al., 2016).

3.2.2 Identificação Bacteriana

Para evitar infecções e conter a propagação de um microrganismo específico em um hospital, é de suma importância compreender os possíveis reservatórios e os modos de transmissão a ele associados. Além disso, a identificação da origem e do desenvolvimento do agente etiológico da infecção é essencial, pois fornece informações cruciais para o controle das

infecções hospitalares em nível local e global (PELEG et al., 2008, SETHUVE et al., 2019). A identificação do gênero por meio de características fenotípicas é amplamente utilizada, mas a identificação das espécies é um processo complexo (GERNER-SMIDT et al., 1991). De forma significativa, os métodos microbiológicos convencionais, embora sejam de baixo custo, foram substituídos ao longo das últimas décadas pelos métodos de tipagem molecular. Isso se deve ao fato de que os métodos de tipagem molecular oferecem uma resposta rápida, além de alta sensibilidade e especificidade (PELEG et al., 2008, SETHUVE et al., 2019).

A identificação por métodos moleculares, que são amplamente adotados atualmente, inclui técnicas como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), análise de repetições em tandem de número variável em múltiplos loci (MLVA), tipagem de sequências multilocus (MLST), outras técnicas baseadas em PCR e métodos baseados em sequenciamento, como o sequenciamento completo do genoma (WGS) (ZARRILLI et al., 2013).

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é amplamente utilizada na análise da epidemiologia molecular das infecções por *A. baumannii*. Essa técnica envolve o encapsulamento do DNA cromossômico completo das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição, como a endonuclease de restrição *ApaI*. Através da aplicação de campos elétricos alternados, essa técnica permite a separação dos fragmentos de DNA cromossômico. Ao gerar padrões distintos de fragmentos, ela possibilita a detecção de transmissões bacterianas dentro e entre hospitais, sendo especialmente valiosa para investigações de surtos de curto prazo em nível local. (PELEG et al., 2008, ZARRILLI et al., 2013).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é empregada para amplificar regiões específicas de cada espécie, utilizando diferentes iniciadores. Essas regiões incluem o gene codificado da subunidade 16S rRNA e 23S rRNA, bem como os genes *OmpA*, *recA*, *gyrB* e *rpoB* (GUNDI et al., 2009, KARAH et al., 2012, MCCONNELL; ACTIS; PACHON, 2013, WANG et al., 2014, PEERAYEH e KARMOSTAJI, 2015). Além disso, o PCR multiplex é utilizado para detectar genes de oxacilinas, que hidrolisam antibióticos beta-lactâmicos, encontrados intrinsecamente em algumas espécies do gênero *Acinetobacter sp.* (WOODFORD et al., 2006; KAMOLVIT et al., 2014).

O sequenciamento completo do genoma é outra técnica de grande relevância para a identificação molecular. É amplamente reconhecido como uma ferramenta fundamental em estudos de vigilância epidemiológica. O sequenciamento completo do genoma é empregado tanto em investigações retrospectivas de surtos, visando identificar fontes ambientais e casos adicionais, quanto em investigações de surtos em tempo real, para confirmar sua existência e

monitorar o surgimento e disseminação de mecanismos de resistência mutacional (BOGATY et al., 2018).

Além disso, a microbiologia clínica tem feito progressos na busca por métodos rápidos e precisos para a identificação de patógenos que contribuam para o diagnóstico médico. A espectrometria de massa de tempo de voo com ionização de dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF MS) surge como uma alternativa ao sistema convencional de identificação, que se baseia na caracterização bioquímica e molecular. Essa técnica permite a detecção de biomoléculas maiores intactas, como proteínas (CROXATTO et al., 2011).

A técnica do MALDI-TOF MS envolve a mistura da amostra com uma matriz em uma placa de metal condutora. Após a cristalização da matriz e do material microbiano, a placa de metal é introduzida no espectrômetro de massa e é bombardeada com pulsos breves de laser. As moléculas desorbidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo eletrostático e ejetadas através de um tubo de voo de metal submetido a vácuo até chegarem a um detector, onde íons menores viajam mais rápido do que íons maiores. Assim, os bioanalitos são separados de acordo com seu tempo de voo (TOF), criando um espectro de massa composto por picos de relação massa/carga (m/z) com intensidades variáveis. A identificação de espécies clinicamente relevantes em laboratórios de rotina é baseada na comparação do espectro de proteínas gerado a partir de células bacterianas intactas inteiras com um banco de dados de perfis de proteínas de referência específicos da espécie usando um algoritmo classificador de espectros original (BIZZINI et al., 2010; CROXATTO et al., 2011, DUBOIS et al., 2011) (Figura 1).

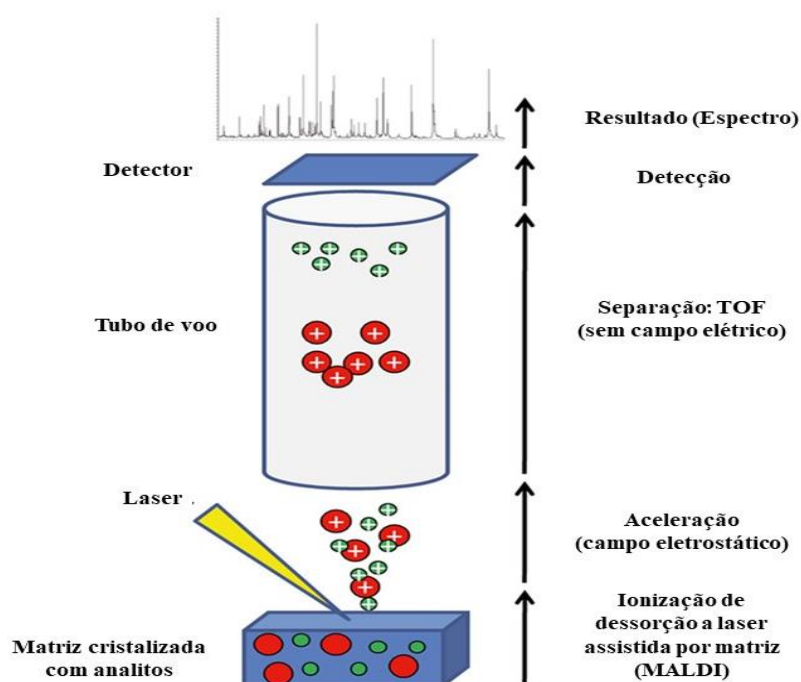


Figura 1: Descrição técnica de MALDI-TOF MS. Fonte: adaptado de CROXATTO et al., 2011.

3.2.3 Importância clínica e fatores de virulência de *Acinetobacter baumannii*

No hospedeiro humano, no período de 30 anos, essa bactéria se transformou de amplamente suscetíveis para multirresistentes nos dias atuais. Membros desse gênero começaram a ser reconhecidos como patógenos nosocomiais significativos durante o início da década de 1970 (BONOMO e SZABO, 2006; JAIN et al., 2019; IBRAHIM et al., 2021; FONSECA et al., 2021). Nos primeiros estudos *in vitro*, a maioria dos isolados clínicos era suscetível a agentes antimicrobianos comumente usados, como ampicilina (60-70%), gentamicina (92,5%), cloranfenicol (57%) e ácido nalidíxico (97,8%) (BERGOGNE-BEREZIN e TOWNER, 1996; VAN LOOVEREN et al., 2004; PELEG et al., 2008; TOWNER, 2009). No entanto, isolados clínicos multirresistentes (MDR) de *Acinetobacter* têm sido relatados cada vez mais durante as últimas duas décadas, quase certamente como consequência do uso extensivo de potentes agentes antimicrobianos de amplo espectro em hospitais em todo o mundo. *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii* e *A. baumannii* são as espécies de *Acinetobacter* mais frequentemente relatadas na literatura clínica (MATHAI et al., 2012; BENNETT et al., 2019).

A. baumannii é um patógeno oportunista, responsável por infecções adquiridas em hospitais e comunidades que normalmente causam infecções graves em hospedeiros imunocomprometidos (JOLY-GUILLOU, 2005; IBRAHIM et al., 2021; FONSECA et al., 2021). Suas infecções têm sido clinicamente proeminentes em países tropicais, sendo um problema recorrente durante guerras, desastres naturais e surtos multihospitalares (HOUANG et al., 2001; JAIN et al., 2019; O'DONNELL et al., 2021). Um dos fatores alarmantes é a capacidade de acumular diversos mecanismos de resistência a antibióticos de último recurso, fazendo com que essa bactéria esteja entre os patógenos nosocomiais mais problemático e tornando ameaça urgente à saúde pública pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Assim, pesquisas e desenvolvimento de novos antibióticos são extremamente recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (HOU e YANG, 2015; JAIN et al., 2019).

Os fatores de risco associados à colonização ou infecção incluem hospitalização prolongada, internação em unidade de terapia intensiva, procedimentos cirúrgicos recentes, exposição a agentes antimicrobianos, uso de cateter venoso central, hospitalização prévia, residência em casa de repouso e pressão de colonização local em pacientes suscetíveis (MAHGOUB et al., 2002; JANG et al., 2009; O'DONNELL et al., 2021). A associação de *A. baumannii* com pneumonia, bacteremia, infecções de feridas, infecções do trato urinário e meningite tem sido cada vez mais relatadas (ELIOPOULOS et al., 2008; PELEG et al., 2008; IBRAHIM et al., 2021; FONSECA et al., 2021). A Pneumonia em ambiente hospitalar é a

infecção mais comum provocada por *A. baumannii* principalmente em pacientes que necessitaram de ventilação mecânica na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (DIKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; HAQUE et al., 2018). Outra infecção de importante relevância clínica é causada em pacientes que apresentam queimaduras, pois podem atrasar a cura da ferida, evoluir para infecções de tecidos subjacentes e consequentemente bacteremia (CHIM; TAN; SONG, 2007; HAQUE et al., 2018).

Já foram identificados e caracterizados diversos mecanismos que envolvem a virulência de *A. baumannii*, entre estes estão inclusos: a capacidade da bactéria em aderir, colonizar e invadir as células epiteliais humanas, assim como, superfícies abióticas pela produção de fimbrias e/ou cápsula polissacarídica; formação de biofilme; produção de lipopolissacarídeos (LPS); produção de enzimas hidrolíticas e sistemas de aquisição de ferro (ZIMBLER et al., 2009; PENWELL et al., 2012; KIM et al., 2014). A maior patogenicidade de isolados *A. baumannii* é a presença de determinantes de virulência como a membrana externa, vesículas de membrana externa, fosfolipases D e biofilme (NOWAK e PALUCHOWSKA, 2016).

As vesículas de membrana externa (OMVs) possuem capacidade de transportar fatores de virulência OmpA, e desempenham função de disseminar resistência a antibióticos, com a transferência gênica do gene bla_{OXA-24} (RUMBO et al., 2011). A proteína de membrana externa A (OmpA) é uma porina trimérica capaz de induzir apoptose com liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C e o fator indutor de apoptose. Na infecção, induz danos nas células respiratórias humanas, colabora com a colonização nos estágios iniciais, pois desempenha uma função na adesão e invasão de células do hospedeiro, e ainda contribui para a disseminação de *A. baumannii* (CHOI et al., 2008; LIN e LAN, 2015). Além disso, essa proteína OmpA, principal proteína de membrana externa, juntamente com csuE, envolvido na formação do sistema pili - uma estrutura filamentosa encontrada em várias bactérias gram-negativas - pode desempenhar um papel crucial na facilitação da persistência e sobrevivência de *A. baumannii*. Essas proteínas atuam diminuindo a motilidade bacteriana na superfície e auxiliando na formação de biofilmes, resultando na capacidade de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antimicrobianas. (CLEMMER; BONOMO; RATHER, 2011; CHEN, 2015; HE et al., 2015; SELASI et al., 2016).

A resistência a diferentes antimicrobianos por *A. baumannii* pode ser conferida pela membrana externa, expressão constitutiva de sistemas de bombas de efluxo e a expressão reduzida de porinas na membrana externa, causando alterações fisiológicas na permeabilidade da membrana e atividade metabólica (VILA, MARTÍ, SÁNCHEZ-CÉSPEDA, 2007; HE et al., 2015). Por fim, a capacidade de formar biofilme, resistência à dessecação e desinfetantes e a resistência aos antibióticos permitem sua prospecção em ambiente hospitalar e facilita o

desenvolvimento de infecções associadas a assistência à saúde e, consequentemente, o aparecimento de surtos (VAN LOOVEREN et al., 2004; PELEG et al., 2008; RANJBAR e FARAHANI et al., 2019).

3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

3.3.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que afetam essencialmente a multiplicação bacteriana, uma vez que podem ter ação bactericida, que causam a morte, ou bacteriostático, que inibem o crescimento (PELEG e HOOPER 2010; ETEBU e ARIKEKPAR, 2016). Existem uma ampla gama de antibióticos com ações direcionadas a diferente alvo na estrutura da célula bacteriana, incluem: inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores da síntese proteica e bloqueio de vias metabólicas essenciais (BAKHEET e DOIG, 2010).

As principais classes de antibióticos em uso clínico destacam os β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (HUTCHINGS et al., 2019) (Figura 2).

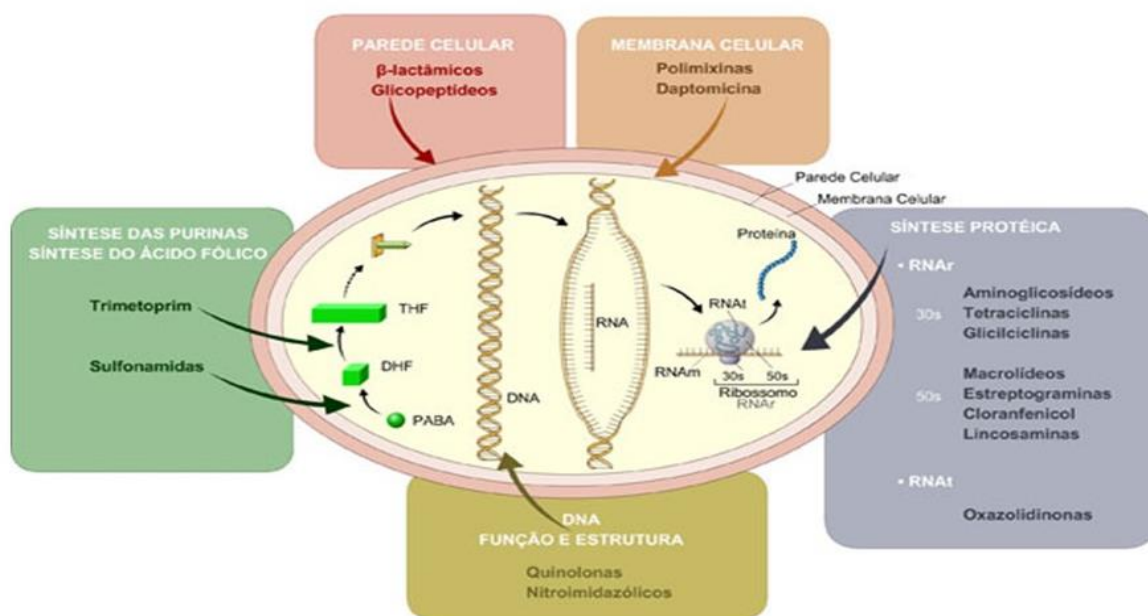


Figura 2: Mecanismos de ação dos antimicrobianos em bactéria, e efeitos e os locais onde atuam. Fonte: Adaptado de RIBEIRO, 2018.

Os antibióticos β -lactâmicos são compostos que compreendem grupo de antimicrobianos com mecanismo de ação na síntese da parede celular, esses antibióticos se ligam as proteínas da parede celular, provocando a inativação deste conjunto de enzimas transpeptidases, que catalisam ligação cruzada entre as cadeias de peptideoglicano leva a formação de esferoblastos e a uma rápida lise celular. A estrutura molecular possui um anel β -lactâmico, que é um anel heterocíclico, com estrutura heteroatômica constituído por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio (DRAWZ e BONOMO, 2010; LIMA et al., 2020).

A classe dos antibióticos β -lactâmicos disponível na prática clínica representa quase dois terços das prescrições hospitalares, das quais se destacam as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams, sendo todas portadoras de um anel β -lactâmico, mas diferem-se na estrutura química e, conseqüentemente, modificam as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência (SAMAHAKFOURY, 2003; LIMA et al., 2020) (Figura 3).

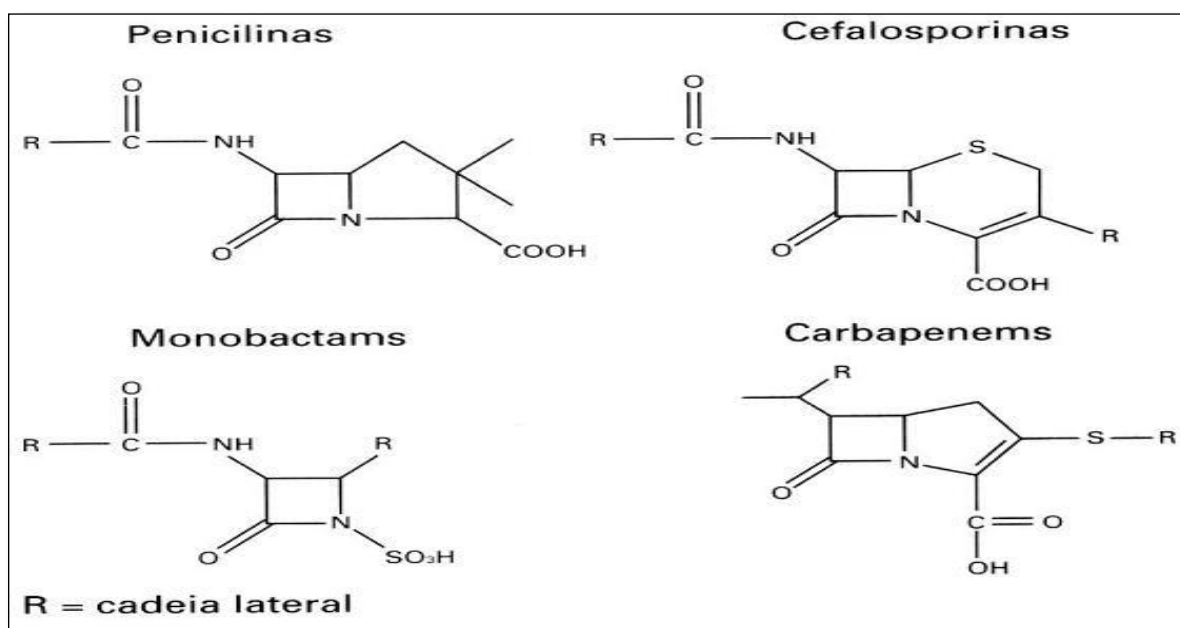


Figura 3: Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos. Fonte: WILLIAMS, 1999.

Os carbapenêmicos são da classe de β -lactâmicos mais eficaz, possui um amplo espectro de ação contra bactérias gram positivo e gram negativo, devido a um grupo trans- α -1-hidroxietil na posição 6, diferem de outros β -lactâmicos devido a substituição de um dos carbonos do anel secundário por um átomo de enxofre e uma ligação insaturada entre os carbonos 2 e 3 do anel secundário, tornando mais estável a inativação de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e do tipo AmpC (ZHANEL et al., 2007; NICOLAU, 2007; MANCUSO et al., 2021).

3.3.2 Resistência a β -lactâmicos

A resistência a antimicrobianos ocorre por fatores genéticos, podendo ser intrínseca mediada por genes cromossômicos e está relacionado a estrutura e fisiologia natural do microrganismo; ou adquirida por mutação genética, e/ou transferência horizontal de genes estruturais endógenos ou regulatórios entre organismos, por meio de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e bacteriófagos no processo de conjugação, transformação, transdução e transposição (DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; KYRIAKIDIS et al., 2021).

A extensa utilização de antibióticos no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* resultou na seleção de isolados altamente resistentes à maioria dos antimicrobianos atualmente disponíveis, incluindo os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Além disso, a persistência desse microrganismo em ambientes hospitalares intensifica a emergência global dessa situação (TACCONE et al., 2006, VALENCIA et al., 2009; THEURETZBACHER et al., 2020). *A. baumannii* tem se mostrado uma espécie cada vez mais importante e exigente em infecções associadas a assistência à saúde (PELEG et al., 2008; IBRAHIM et al., 2021). A natureza resistente a drogas do patógeno, ou seja, tem competência natural de adquirir genes de resistência através da transferência horizontal de genes, e seus padrões de suscetibilidade incomuns e imprevisíveis tornam as decisões empíricas e terapêuticas ainda mais difíceis (TRAGLIA et al., 2016; FONSECA et al., 2021).

Os principais mecanismos de resistência de bactérias são: (i) modificação de sítios alvo, (ii) inativação enzimática, (iii) efluxo ativo e (iiii) diminuição no influxo de drogas (CHAKRAVARTY, 2020). No entanto, o mecanismo mais frequente em *A. baumannii* é decorrente da produção de β -lactamases adquiridas, incluindo serina e metalo- β -lactamases, as quais conferem resistência aos carbapenêmicos capazes da inativação hidrolítica do anel β -lactâmico dos antibióticos (HAEGGMAN et al., 2004; TSAKRIS et al., 2008; LEE et al., 2017; MANCUSO et al., 2021).

As β -lactamases são enzimas que inativam os antibióticos β -lactâmicos e atuam como um dos principais mecanismos associados à resistência (BUSH e JACOBY, 2010). São classificadas de acordo Ambler (1980), sendo divididas em quatro classe conforme a estrutura molecular do centro ativo e sequência de aminoácidos. As Classes A, C e D são serina β -lactamases e a classe B são denominadas de metalo- β -lactamases, todas as classes já foram identificadas em *Acinetobacter* (PEREZ et al, 2007; ALI et al., 2018; TOOKE et al., 2019).

A classe A são as penicilinases, cefalosporinases, β -lactamases de amplo espectro, β -lactamases de espectro estendido (ES β L) e carbapenemases e são capazes de inativar

penicilinas, cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e carbapenêmicos. São inibidas por inibidores de β -lactamases, clavulânico, sulbactam e tazobactam e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e a monobactâmicos, podendo conferir resistência em baixos níveis aos carbapenêmicos, com exceção de algumas enzimas do tipo KPC (JEON et al., 2016).

A classe B são as Metallo- β -lactamases (MBLs), uma das principais enzimas relacionadas com a redução da sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e foram descritas em amostras de *Acinetobacter* spp. depois da década de 90 (POIREL et al, 2000). Essas enzimas exigem o Zn^{2+} como co-fator para atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes. Hidrolisam eficientemente β -lactâmicos, inclusive carbapenêmicos, mas não aztreonam, e são inibidas por agentes quelantes, como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (JEON et al., 2016).

A classe C de Ambler engloba várias enzimas, incluindo as penicilinase e cefalosporinase β -lactamases do tipo AmpC e são enzimas cromossômicas que geralmente conferem resistência às penicilinas, inclusive às associações com inibidores de β -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª gerações e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH; JACOBY, 2010, BONNIN et al., 2011). A resistência às cefalosporinas devido à produção desta enzima é também uma característica comum em *A. baumannii* (WOODFORD et al., 2006).

As classes D as oxacilinases (OXA) são enzimas que apresentam o agrupamento serina no seu sítio ativo, mais de 150 variantes distintas dessas enzimas já foram descritas, contudo apenas 45 exibem a capacidade de inativar principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como a cefepima. (BOU et al, 2000; BROWN; AMYES, 2006; CASTILHO et al., 2017). As OXA do tipo carbapenemases são adquiridas por elementos genéticos móveis, e frequentemente encontrados em *A. baumannii* especialmente no ambiente hospitalar (POIREL; NAAS; NORDMANN et al., 2010; GIRIJA et al., 2019).

As oxacilinases são classificadas em seis subgrupos principais: são blaOXA-23-like (OXA-23, OXA-27, e OXA-49), blaOXA-24-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, e OXA-72), blaOXA-58-like, blaOXA-143-like (OXA-143, OXA231 e OXA-253), blaOXA-235 e blaOXA-51-like, este último subgrupo presente a nível cromossomal na espécie *A. baumannii*, mas que não proporciona um nível de resistência clinicamente efetiva a carbapenêmicos (EVANS, HAMOUDA, AMYES, 2013; YANG e RUI, 2016 ; KOBBS et al., 2016). Para que os genes blaOXA sejam expressos, muitas vezes é necessária a presença de elemento de inserção. Dentre as já descritas em *Acinetobacter*, as mais comumente conhecidas são as ISAbal, ISAbal1, ISAbal2, ISAbal3, ISAbal4, ISAbal5, ISAbal6, ISAbal7, ISAbal8, ISAbal9, ISAbal10, ISAbal11, ISAbal12, ISAbal13, ISAbal14, ISAbal15, ISAbal16, ISAbal17, ISAbal18, ISAbal19, ISAbal20, ISAbal21, ISAbal22, ISAbal23, ISAbal24, ISAbal25, ISAbal26, ISAbal27, ISAbal28, ISAbal29, ISAbal30, ISAbal31, ISAbal32, ISAbal33, ISAbal34, ISAbal35, ISAbal36, ISAbal37, ISAbal38, ISAbal39, ISAbal40, ISAbal41, ISAbal42, ISAbal43, ISAbal44, ISAbal45, ISAbal46, ISAbal47, ISAbal48, ISAbal49, ISAbal50, ISAbal51, ISAbal52, ISAbal53, ISAbal54, ISAbal55, ISAbal56, ISAbal57, ISAbal58, ISAbal59, ISAbal60, ISAbal61, ISAbal62, ISAbal63, ISAbal64, ISAbal65, ISAbal66, ISAbal67, ISAbal68, ISAbal69, ISAbal70, ISAbal71, ISAbal72, ISAbal73, ISAbal74, ISAbal75, ISAbal76, ISAbal77, ISAbal78, ISAbal79, ISAbal80, ISAbal81, ISAbal82, ISAbal83, ISAbal84, ISAbal85, ISAbal86, ISAbal87, ISAbal88, ISAbal89, ISAbal90, ISAbal91, ISAbal92, ISAbal93, ISAbal94, ISAbal95, ISAbal96, ISAbal97, ISAbal98, ISAbal99, ISAbal100, ISAbal101, ISAbal102, ISAbal103, ISAbal104, ISAbal105, ISAbal106, ISAbal107, ISAbal108, ISAbal109, ISAbal110, ISAbal111, ISAbal112, ISAbal113, ISAbal114, ISAbal115, ISAbal116, ISAbal117, ISAbal118, ISAbal119, ISAbal120, ISAbal121, ISAbal122, ISAbal123, ISAbal124, ISAbal125, ISAbal126, ISAbal127, ISAbal128, ISAbal129, ISAbal130, ISAbal131, ISAbal132, ISAbal133, ISAbal134, ISAbal135, ISAbal136, ISAbal137, ISAbal138, ISAbal139, ISAbal140, ISAbal141, ISAbal142, ISAbal143, ISAbal144, ISAbal145, ISAbal146, ISAbal147, ISAbal148, ISAbal149, ISAbal150, ISAbal151, ISAbal152, ISAbal153, ISAbal154, ISAbal155, ISAbal156, ISAbal157, ISAbal158, ISAbal159, ISAbal160, ISAbal161, ISAbal162, ISAbal163, ISAbal164, ISAbal165, ISAbal166, ISAbal167, ISAbal168, ISAbal169, ISAbal170, ISAbal171, ISAbal172, ISAbal173, ISAbal174, ISAbal175, ISAbal176, ISAbal177, ISAbal178, ISAbal179, ISAbal180, ISAbal181, ISAbal182, ISAbal183, ISAbal184, ISAbal185, ISAbal186, ISAbal187, ISAbal188, ISAbal189, ISAbal190, ISAbal191, ISAbal192, ISAbal193, ISAbal194, ISAbal195, ISAbal196, ISAbal197, ISAbal198, ISAbal199, ISAbal200, ISAbal201, ISAbal202, ISAbal203, ISAbal204, ISAbal205, ISAbal206, ISAbal207, ISAbal208, ISAbal209, ISAbal210, ISAbal211, ISAbal212, ISAbal213, ISAbal214, ISAbal215, ISAbal216, ISAbal217, ISAbal218, ISAbal219, ISAbal220, ISAbal221, ISAbal222, ISAbal223, ISAbal224, ISAbal225, ISAbal226, ISAbal227, ISAbal228, ISAbal229, ISAbal230, ISAbal231, ISAbal232, ISAbal233, ISAbal234, ISAbal235, ISAbal236, ISAbal237, ISAbal238, ISAbal239, ISAbal240, ISAbal241, ISAbal242, ISAbal243, ISAbal244, ISAbal245, ISAbal246, ISAbal247, ISAbal248, ISAbal249, ISAbal250, ISAbal251, ISAbal252, ISAbal253, ISAbal254, ISAbal255, ISAbal256, ISAbal257, ISAbal258, ISAbal259, ISAbal260, ISAbal261, ISAbal262, ISAbal263, ISAbal264, ISAbal265, ISAbal266, ISAbal267, ISAbal268, ISAbal269, ISAbal270, ISAbal271, ISAbal272, ISAbal273, ISAbal274, ISAbal275, ISAbal276, ISAbal277, ISAbal278, ISAbal279, ISAbal280, ISAbal281, ISAbal282, ISAbal283, ISAbal284, ISAbal285, ISAbal286, ISAbal287, ISAbal288, ISAbal289, ISAbal290, ISAbal291, ISAbal292, ISAbal293, ISAbal294, ISAbal295, ISAbal296, ISAbal297, ISAbal298, ISAbal299, ISAbal300, ISAbal301, ISAbal302, ISAbal303, ISAbal304, ISAbal305, ISAbal306, ISAbal307, ISAbal308, ISAbal309, ISAbal310, ISAbal311, ISAbal312, ISAbal313, ISAbal314, ISAbal315, ISAbal316, ISAbal317, ISAbal318, ISAbal319, ISAbal320, ISAbal321, ISAbal322, ISAbal323, ISAbal324, ISAbal325, ISAbal326, ISAbal327, ISAbal328, ISAbal329, ISAbal330, ISAbal331, ISAbal332, ISAbal333, ISAbal334, ISAbal335, ISAbal336, ISAbal337, ISAbal338, ISAbal339, ISAbal340, ISAbal341, ISAbal342, ISAbal343, ISAbal344, ISAbal345, ISAbal346, ISAbal347, ISAbal348, ISAbal349, ISAbal350, ISAbal351, ISAbal352, ISAbal353, ISAbal354, ISAbal355, ISAbal356, ISAbal357, ISAbal358, ISAbal359, ISAbal360, ISAbal361, ISAbal362, ISAbal363, ISAbal364, ISAbal365, ISAbal366, ISAbal367, ISAbal368, ISAbal369, ISAbal370, ISAbal371, ISAbal372, ISAbal373, ISAbal374, ISAbal375, ISAbal376, ISAbal377, ISAbal378, ISAbal379, ISAbal380, ISAbal381, ISAbal382, ISAbal383, ISAbal384, ISAbal385, ISAbal386, ISAbal387, ISAbal388, ISAbal389, ISAbal390, ISAbal391, ISAbal392, ISAbal393, ISAbal394, ISAbal395, ISAbal396, ISAbal397, ISAbal398, ISAbal399, ISAbal400, ISAbal401, ISAbal402, ISAbal403, ISAbal404, ISAbal405, ISAbal406, ISAbal407, ISAbal408, ISAbal409, ISAbal410, ISAbal411, ISAbal412, ISAbal413, ISAbal414, ISAbal415, ISAbal416, ISAbal417, ISAbal418, ISAbal419, ISAbal420, ISAbal421, ISAbal422, ISAbal423, ISAbal424, ISAbal425, ISAbal426, ISAbal427, ISAbal428, ISAbal429, ISAbal430, ISAbal431, ISAbal432, ISAbal433, ISAbal434, ISAbal435, ISAbal436, ISAbal437, ISAbal438, ISAbal439, ISAbal440, ISAbal441, ISAbal442, ISAbal443, ISAbal444, ISAbal445, ISAbal446, ISAbal447, ISAbal448, ISAbal449, ISAbal450, ISAbal451, ISAbal452, ISAbal453, ISAbal454, ISAbal455, ISAbal456, ISAbal457, ISAbal458, ISAbal459, ISAbal460, ISAbal461, ISAbal462, ISAbal463, ISAbal464, ISAbal465, ISAbal466, ISAbal467, ISAbal468, ISAbal469, ISAbal470, ISAbal471, ISAbal472, ISAbal473, ISAbal474, ISAbal475, ISAbal476, ISAbal477, ISAbal478, ISAbal479, ISAbal480, ISAbal481, ISAbal482, ISAbal483, ISAbal484, ISAbal485, ISAbal486, ISAbal487, ISAbal488, ISAbal489, ISAbal490, ISAbal491, ISAbal492, ISAbal493, ISAbal494, ISAbal495, ISAbal496, ISAbal497, ISAbal498, ISAbal499, ISAbal500, ISAbal501, ISAbal502, ISAbal503, ISAbal504, ISAbal505, ISAbal506, ISAbal507, ISAbal508, ISAbal509, ISAbal510, ISAbal511, ISAbal512, ISAbal513, ISAbal514, ISAbal515, ISAbal516, ISAbal517, ISAbal518, ISAbal519, ISAbal520, ISAbal521, ISAbal522, ISAbal523, ISAbal524, ISAbal525, ISAbal526, ISAbal527, ISAbal528, ISAbal529, ISAbal530, ISAbal531, ISAbal532, ISAbal533, ISAbal534, ISAbal535, ISAbal536, ISAbal537, ISAbal538, ISAbal539, ISAbal540, ISAbal541, ISAbal542, ISAbal543, ISAbal544, ISAbal545, ISAbal546, ISAbal547, ISAbal548, ISAbal549, ISAbal550, ISAbal551, ISAbal552, ISAbal553, ISAbal554, ISAbal555, ISAbal556, ISAbal557, ISAbal558, ISAbal559, ISAbal560, ISAbal561, ISAbal562, ISAbal563, ISAbal564, ISAbal565, ISAbal566, ISAbal567, ISAbal568, ISAbal569, ISAbal570, ISAbal571, ISAbal572, ISAbal573, ISAbal574, ISAbal575, ISAbal576, ISAbal577, ISAbal578, ISAbal579, ISAbal580, ISAbal581, ISAbal582, ISAbal583, ISAbal584, ISAbal585, ISAbal586, ISAbal587, ISAbal588, ISAbal589, ISAbal590, ISAbal591, ISAbal592, ISAbal593, ISAbal594, ISAbal595, ISAbal596, ISAbal597, ISAbal598, ISAbal599, ISAbal600, ISAbal601, ISAbal602, ISAbal603, ISAbal604, ISAbal605, ISAbal606, ISAbal607, ISAbal608, ISAbal609, ISAbal610, ISAbal611, ISAbal612, ISAbal613, ISAbal614, ISAbal615, ISAbal616, ISAbal617, ISAbal618, ISAbal619, ISAbal620, ISAbal621, ISAbal622, ISAbal623, ISAbal624, ISAbal625, ISAbal626, ISAbal627, ISAbal628, ISAbal629, ISAbal630, ISAbal631, ISAbal632, ISAbal633, ISAbal634, ISAbal635, ISAbal636, ISAbal637, ISAbal638, ISAbal639, ISAbal640, ISAbal641, ISAbal642, ISAbal643, ISAbal644, ISAbal645, ISAbal646, ISAbal647, ISAbal648, ISAbal649, ISAbal650, ISAbal651, ISAbal652, ISAbal653, ISAbal654, ISAbal655, ISAbal656, ISAbal657, ISAbal658, ISAbal659, ISAbal660, ISAbal661, ISAbal662, ISAbal663, ISAbal664, ISAbal665, ISAbal666, ISAbal667, ISAbal668, ISAbal669, ISAbal670, ISAbal671, ISAbal672, ISAbal673, ISAbal674, ISAbal675, ISAbal676, ISAbal677, ISAbal678, ISAbal679, ISAbal680, ISAbal681, ISAbal682, ISAbal683, ISAbal684, ISAbal685, ISAbal686, ISAbal687, ISAbal688, ISAbal689, ISAbal690, ISAbal691, ISAbal692, ISAbal693, ISAbal694, ISAbal695, ISAbal696, ISAbal697, ISAbal698, ISAbal699, ISAbal700, ISAbal701, ISAbal702, ISAbal703, ISAbal704, ISAbal705, ISAbal706, ISAbal707, ISAbal708, ISAbal709, ISAbal710, ISAbal711, ISAbal712, ISAbal713, ISAbal714, ISAbal715, ISAbal716, ISAbal717, ISAbal718, ISAbal719, ISAbal720, ISAbal721, ISAbal722, ISAbal723, ISAbal724, ISAbal725, ISAbal726, ISAbal727, ISAbal728, ISAbal729, ISAbal730, ISAbal731, ISAbal732, ISAbal733, ISAbal734, ISAbal735, ISAbal736, ISAbal737, ISAbal738, ISAbal739, ISAbal740, ISAbal741, ISAbal742, ISAbal743, ISAbal744, ISAbal745, ISAbal746, ISAbal747, ISAbal748, ISAbal749, ISAbal750, ISAbal751, ISAbal752, ISAbal753, ISAbal754, ISAbal755, ISAbal756, ISAbal757, ISAbal758, ISAbal759, ISAbal760, ISAbal761, ISAbal762, ISAbal763, ISAbal764, ISAbal765, ISAbal766, ISAbal767, ISAbal768, ISAbal769, ISAbal770, ISAbal771, ISAbal772, ISAbal773, ISAbal774, ISAbal775, ISAbal776, ISAbal777, ISAbal778, ISAbal779, ISAbal780, ISAbal781, ISAbal782, ISAbal783, ISAbal784, ISAbal785, ISAbal786, ISAbal787, ISAbal788, ISAbal789, ISAbal790, ISAbal791, ISAbal792, ISAbal793, ISAbal794, ISAbal795, ISAbal796, ISAbal797, ISAbal798, ISAbal799, ISAbal800, ISAbal801, ISAbal802, ISAbal803, ISAbal804, ISAbal805, ISAbal806, ISAbal807, ISAbal808, ISAbal809, ISAbal810, ISAbal811, ISAbal812, ISAbal813, ISAbal814, ISAbal815, ISAbal816, ISAbal817, ISAbal818, ISAbal819, ISAbal820, ISAbal821, ISAbal822, ISAbal823, ISAbal824, ISAbal825, ISAbal826, ISAbal827, ISAbal828, ISAbal829, ISAbal830, ISAbal831, ISAbal832, ISAbal833, ISAbal834, ISAbal835, ISAbal836, ISAbal837, ISAbal838, ISAbal839, ISAbal840, ISAbal841, ISAbal842, ISAbal843, ISAbal844, ISAbal845, ISAbal846, ISAbal847, ISAbal848, ISAbal849, ISAbal850, ISAbal851, ISAbal852, ISAbal853, ISAbal854, ISAbal855, ISAbal856, ISAbal857, ISAbal858, ISAbal859, ISAbal860, ISAbal861, ISAbal862, ISAbal863, ISAbal864, ISAbal865, ISAbal866, ISAbal867, ISAbal868, ISAbal869, ISAbal870, ISAbal871, ISAbal872, ISAbal873, ISAbal874, ISAbal875, ISAbal876, ISAbal877, ISAbal878, ISAbal879, ISAbal880, ISAbal881, ISAbal882, ISAbal883, ISAbal884, ISAbal885, ISAbal886, ISAbal887, ISAbal888, ISAbal889, ISAbal890, ISAbal891, ISAbal892, ISAbal893, ISAbal894, ISAbal895, ISAbal896, ISAbal897, ISAbal898, ISAbal899, ISAbal900, ISAbal901, ISAbal902, ISAbal903, ISAbal904, ISAbal905, ISAbal906, ISAbal907, ISAbal908, ISAbal909, ISAbal910, ISAbal911, ISAbal912, ISAbal913, ISAbal914, ISAbal915, ISAbal916, ISAbal917, ISAbal918, ISAbal919, ISAbal920, ISAbal921, ISAbal922, ISAbal923, ISAbal924, ISAbal925, ISAbal926, ISAbal927, ISAbal928, ISAbal929, ISAbal930, ISAbal931, ISAbal932, ISAbal933, ISAbal934, ISAbal935, ISAbal936, ISAbal937, ISAbal938, ISAbal939, ISAbal940, ISAbal941, ISAbal942, ISAbal943, ISAbal944, ISAbal945, ISAbal946, ISAbal947, ISAbal948, ISAbal949, ISAbal950, ISAbal951, ISAbal952, ISAbal953, ISAbal954, ISAbal955, ISAbal956, ISAbal957, ISAbal958, ISAbal959, ISAbal960, ISAbal961, ISAbal962, ISAbal963, ISAbal964, ISAbal965, ISAbal966, ISAbal967, ISAbal968, ISAbal969, ISAbal970, ISAbal971, ISAbal972, ISAbal973, ISAbal974, ISAbal975, ISAbal976, ISAbal977, ISAbal978, ISAbal979, ISAbal980, ISAbal981, ISAbal982, ISAbal983, ISAbal984, ISAbal985, ISAbal986, ISAbal987, ISAbal988, ISAbal989, ISAbal990, ISAbal991, ISAbal992, ISAbal993, ISAbal994, ISAbal995, ISAbal996, ISAbal997, ISAbal998, ISAbal999, ISAbal1000, ISAbal1001, ISAbal1002, ISAbal1003, ISAbal1004, ISAbal1005, ISAbal1006, ISAbal1007, ISAbal1008, ISAbal1009, ISAbal1010, ISAbal1011, ISAbal1012, ISAbal1013, ISAbal1014, ISAbal1015, ISAbal1016, ISAbal1017, ISAbal1018, ISAbal1019, ISAbal1020, ISAbal1021, ISAbal1022, ISAbal1023, ISAbal1024, ISAbal1025, ISAbal1026, ISAbal1027, ISAbal1028, ISAbal1029, ISAbal1030, ISAbal1031, ISAbal1032, ISAbal1033, ISAbal1034, ISAbal1035, ISAbal1036, ISAbal1037, ISAbal1038, ISAbal1039, ISAbal1040, ISAbal1041, ISAbal1042, ISAbal1043, ISAbal1044, ISAbal1045, ISAbal1046, ISAbal1047, ISAbal1048, ISAbal1049, ISAbal1050, ISAbal1051, ISAbal1052, ISAbal1053, ISAbal1054, ISAbal1055, ISAbal1056, ISAbal1057, ISAbal1058, ISAbal1059, ISAbal1060, ISAbal1061, ISAbal1062, ISAbal1063, ISAbal1064, ISAbal1065, ISAbal1066, ISAbal1067, ISAbal1068, ISAbal1069, ISAbal1070, ISAbal1071, ISAbal1072, ISAbal1073, ISAbal1074, ISAbal1075, ISAbal1076, ISAbal1077, ISAbal1078, ISAbal1079, ISAbal1080, ISAbal1081, ISAbal1082, ISAbal1083, ISAbal1084, ISAbal1085, ISAbal1086, ISAbal1087, ISAbal1088, ISAbal1089, ISAbal1090, ISAbal1091, ISAbal1092, ISAbal1093, ISAbal1094, ISAbal1095, ISAbal1096, ISAbal1097, ISAbal1098, ISAbal1099, ISAbal1100, ISAbal1101, ISAbal1102, ISAbal1103, ISAbal1104, ISAbal1105, ISAbal1106, ISAbal1107, ISAbal1108, ISAbal1109, ISAbal1110, ISAbal1111, ISAbal1112, ISAbal1113, ISAbal1114, ISAbal1115, ISAbal1116, ISAbal1117, ISAbal1118, ISAbal1119, ISAbal1120, ISAbal1121, ISAbal1122, ISAbal1123, ISAbal1124, ISAbal1125, ISAbal1126, ISAbal1127, ISAbal1128, ISAbal1129, ISAbal1130, ISAbal1131, ISAbal1132, ISAbal1133, ISAbal1134, ISAbal1135, ISAbal1136, ISAbal1137, ISAbal1138, ISAbal1139, ISAbal1140, ISAbal1141, ISAbal1142, ISAbal1143, ISAbal1144, ISAbal1145, ISAbal1146, ISAbal1147, ISAbal1148, ISAbal1149, ISAbal1150, ISAbal1151, ISAbal1152, ISAbal1153, ISAbal1154, ISAbal1155, ISAbal1156, ISAbal1157, ISAbal1158, ISAbal1159, ISAbal1160, ISAbal1161, ISAbal1162, ISAbal1163, ISAbal1164, ISAbal1165, ISAbal1166, ISAbal1167, ISAbal1168, ISAbal1169, ISAbal1170, ISAbal1171, ISAbal1172, ISAbal1173, ISAbal1174, ISAbal1175, ISAbal1176, ISAbal1177, ISAbal1178, ISAbal1179, ISAbal1180, ISAbal1181, ISAbal1182, ISAbal1183, ISAbal1184, ISAbal1185, ISAbal1186, ISAbal1187, ISAbal1188, ISAbal1189, ISAbal1190, ISAbal1191, ISAbal1192, ISAbal1193, ISAbal1194, ISAbal1195, ISAbal1196, ISAbal1197, ISAbal1198, ISAbal1199, ISAbal1200, ISAbal1201, ISAbal1202, ISAbal1203, ISAbal1204, ISAbal1205, ISAbal1206, ISAbal1207, ISAbal1208, ISAbal1209, ISAbal1210, ISAbal1211, ISAbal1212, ISAbal1213, ISAbal1214, ISAbal1215, ISAbal1216, ISAbal1217, ISAbal1218, ISAbal1219, ISAbal1220, ISAbal1221, ISAbal1222, ISAbal1223, ISAbal1224, ISAbal1225, ISAbal1226, ISAbal1227, ISAbal1228, ISAbal1229, ISAbal1230, ISAbal1231, ISAbal1232, ISAbal1233, ISAbal1234, ISAbal1235, ISAbal1236, ISAbal1237, ISAbal1238, ISAbal1239, ISAbal1240, ISAbal1241, ISAbal1242, ISAbal1243, ISAbal1244, ISAbal1245, ISAbal1246, ISAbal1247, ISAbal1248, ISAbal1249, ISAbal1250, ISAbal1251, ISAbal1252, ISAbal1253, ISAbal1254, ISAbal1255, ISAbal1256, ISAbal1257, ISAbal1258, ISAbal1259, ISAbal1260, ISAbal1261, ISAbal1262, ISAbal1263, ISAbal1264, ISAbal1265, ISAbal1266, ISAbal1267, ISAbal1268, ISAbal1269, ISAbal1270, ISAbal1271, ISAbal1272, ISAbal1273, ISAbal1274, ISAbal1275, ISAbal1276, ISAbal1277, ISAbal1278, ISAbal1279, ISAbal1280, ISAbal1281, ISAbal1282, ISAbal1283, ISAbal1284, ISAbal1285, ISAbal1286, ISAbal1287, ISAbal1288, ISAbal1289, ISAbal1290, ISAbal1291, ISAbal1292, ISAbal1293, ISAbal1294, ISAbal1295, ISAbal1296, ISAbal1297, ISAbal1298, ISAbal1299, ISAbal1300, ISAbal1301, ISAbal1302, ISAbal1303, ISAbal1304, ISAbal1305, ISAbal1306, ISAbal1307, ISAbal1308, ISAbal1309, ISAbal1310, ISAbal1311, ISAbal1312, ISAbal1313, ISAbal1314, ISAbal1315, ISAbal1316, ISAbal1317, ISAbal1318, ISAbal1319, ISAbal1320, ISAbal1321, ISAbal1322, ISAbal1323, ISAbal1324, ISAbal1325, ISAbal1326, ISAbal1327, ISAbal1328, ISAbal1329, ISAbal1330, ISAbal1331, ISAbal1332, ISAbal1333, ISAbal1334, ISAbal1335, ISAbal1336, ISAbal1337, ISAbal1338, ISAbal1339, ISAbal1340, ISAbal1341, ISAbal1342, ISAbal1343, ISAbal1344, ISAbal1345, ISAbal1346, ISAbal1347, ISAbal1348, ISAbal1349, ISAbal1350, ISAbal1351, ISAbal1352, ISAbal1353, ISAbal1354, ISAbal1355, ISAbal1356, ISAbal1357, ISAbal1358, ISAbal1359, ISAbal1360, ISAbal1361, ISAbal1362, ISAbal1363, ISAbal1364, ISAbal1365, ISAbal1366, ISAbal1367, ISAbal1368, ISAbal1369, ISAbal1370, ISAbal1371, ISAbal1372, ISAbal1373, ISAbal1374, ISAbal1375, ISAbal1376, ISAbal1377, ISAbal1378, ISAbal1379, ISAbal1380, ISAbal1381, ISAbal1382, ISAbal1383, ISAbal1384, ISAbal1385, ISAbal1386, ISAbal1387, ISAbal1388, ISAbal1389, ISAbal1390, ISAbal1391, ISAbal1392, ISAbal1393, ISAbal1394, ISAbal1395, ISAbal1396, ISAbal1397, ISAbal1398, ISAbal1399, ISAbal1400, ISAbal1401, ISAbal1402, ISAbal1403, ISAbal1404, ISAbal1405, ISAbal1406, ISAbal1407, ISAbal1408, ISAbal1409, ISAbal1410, ISAbal1411, ISAbal1412, ISAbal1413, ISAbal1414, ISAbal1415, ISAbal1416, ISAbal1417, ISAbal1418, ISAbal1419, ISAbal1420, ISAbal1421, ISAbal1422, ISAbal1423, ISAbal1424, ISAbal1425, ISAbal1426, ISAbal1427, ISAbal1428, ISAbal1429, ISAbal1430, ISAbal1431, ISAbal1432, ISAbal1433, ISAbal1434, ISAbal1435, ISAbal1436, ISAbal1437, ISAbal1438, ISAbal1439, ISAbal1440, ISAbal1441, ISAbal1442, ISAbal1443, ISAbal1444, ISAbal1445, ISAbal1446, ISAbal1447, ISAbal1448, ISAbal1449, ISAbal1450, ISAbal1451, ISAbal1452, ISAbal1453, ISAbal1454, ISAbal1455, ISAbal1456, ISAbal1457, ISAbal1458, ISAbal1459, ISAbal1460, ISAbal1461, ISAbal1462, ISAbal1463, ISAbal1464, ISAbal1465, ISAbal1466, ISAbal1467, ISAbal1468, ISAbal1469, ISAbal1470, ISAbal1471, ISAbal1472, ISAbal1473, ISAbal1474, ISAbal1475, ISAbal1476, ISAbal1477, ISAbal1478, ISAbal1479, ISAbal1480, ISAbal1481, ISAbal1482, ISAbal1483, ISAbal1484, ISAbal1485, ISAbal1486, ISAbal1487, ISAbal1488, ISAbal1489, ISAbal1490, ISAbal1491, ISAbal1492, ISAbal1493, ISAbal1494, ISAbal1495, ISAbal1496, ISAbal1497, ISAbal1498, ISAbal1499, ISAbal1500, ISAbal1501, ISAbal1502, ISAbal1503, ISAbal1504, ISAbal1505, ISAbal1506, ISAbal1507, ISAbal1508, ISAbal1509, ISAbal1510, ISAbal1511, ISAbal1512, ISAbal1513, ISAbal1514, ISAbal1515, ISAbal1516, ISAbal1517, ISAbal1518, ISAbal1519, ISAbal1520, ISAbal1521, ISAbal1522, ISAbal1523, ISAbal1524, ISAbal1525, ISAbal1526, ISAbal1527, ISAbal1528, ISAbal1529, ISAbal1530, ISAbal1531, ISAbal1532, ISAbal1533, ISAbal1534, ISAbal1535, ISAbal15

ISAb2, ISAb3 e ISAb4 (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; LEE et al., 2011; CASTILHO et al., 2017).

3.3.3 Resistência aos carbapenêmicos

Nas últimas décadas, as opções de tratamento para alguns casos de infecções por isolados de *A. baumannii*, são antibióticos das classes dos carbapenêmicos, imipenem e meropenem devido sua boa atividade e baixa toxicidade, visto que, os antibióticos penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclina apresentaram resistência (EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; THEURETZBACHER et al., 2020). Os países da América Latina apresentaram os maiores índices de acúmulo de mecanismo de resistência do mundo, sendo verificado na Argentina (60%) e no Brasil (56%) (LABARCA et al., 2016). Os carbapenêmicos, imipenem e meropenem são os agentes mais importantes para o tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes, foi inicialmente introduzida em 1985, porém suas taxas de suscetibilidades vêm declinando de forma considerável (DIJKSHOORN et al., 2007; MARRA et al., 2011).

Diversos trabalhos destacam que em certas regiões do mundo as taxas de resistência aos carbapenêmicos superam 50% (Figura 3). Há uma tendência de aumento de resistência aos carbapenêmicos em infecções por *A. baumannii* (KIM et al., 2014; MA e McCLEAN, 2021). Taxas de resistência ao imipenem e meropenem principalmente na América Latina, aumentaram 54,2% e 49,7% respectivamente, no período de 2001 a 2010 de acordo com os dados do SENTRY (Programa de Vigilância Antimicrobiana). Por outro lado, para colistina não verificou aumento expressivo no período 2006 a 2010 (GALES et al., 2006; GALES et al., 2011; GALES et al., 2012) (Tabela -1). Dados recentes do SENTRY revelaram que as taxas de MDR foram mais altas entre os bacilos Gram-negativos (GNB) não fermentadores, e a colistina foi o único agente com atividade previsível contra o complexo *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* (97% suscetível) (DIEKEMA et al., 2019).

No período de 2007 a 2010, levantamentos do BrSCOPE (Vigilância e Controle Brasileiro de Patógenos de Importância Epidemiológica) indicaram que, cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos não foram eficazes contra mais de 50% das cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de infecções nosocomiais da corrente sanguínea de 16 hospitais geograficamente dispersos pelas cinco regiões do Brasil (MARRA et al., 2011). Em outro estudo 47% dos isolados clínicos apresentavam resistência aos carbapenêmicos (BRAGA et al., 2019).

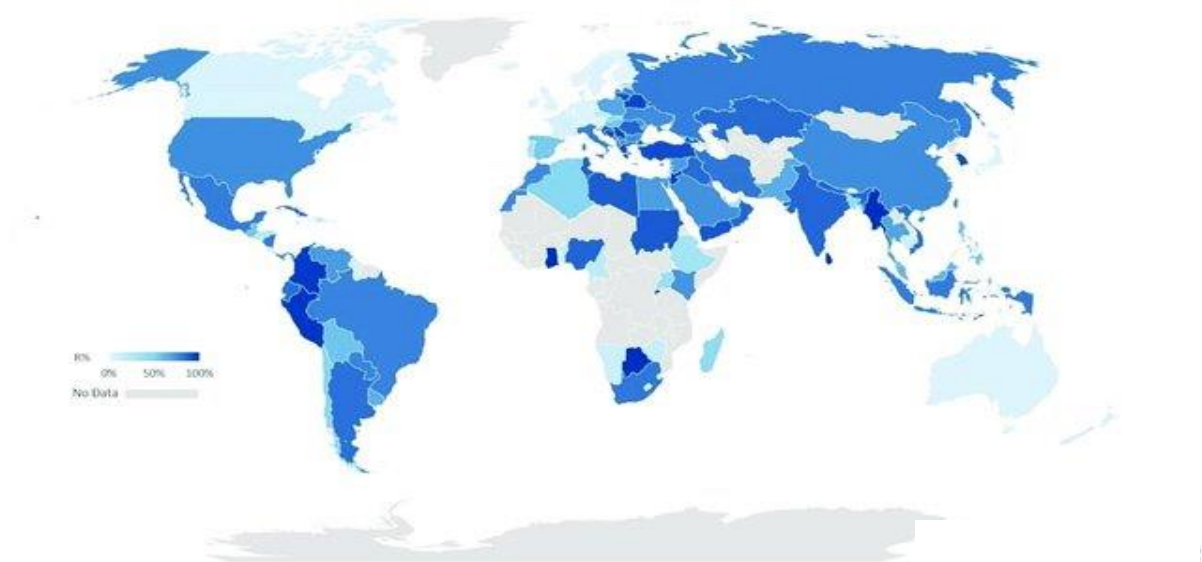


Figura 4: Epidemiologia de infecções por *A. baumannii*. resistentes a carbapenem. O tom de azul representa o nível de resistência aos carbapenêmicos em todo o mundo durante a última década (2009-2018). Fonte: MA; MCCLEAN, 2021.

A. baumannii resistente aos carbapenêmicos estão associadas as características dos hospitais, localização geográfica, tipo de enfermaria e sítios anatômicos (LIU et al., 2015; CASTILHO et al., 2017). Embora quando o tratamento com carbapenêmicos e aminoglicosídeos não apresentam eficácia contra *A. baumannii*, a indicação terapêutica são as polimixinas (polimixina B e colistina). São raros casos, mas já tem relatos de resistência à polimixinas de isolados clínicos de *A. baumannii* (CHEAH et al., 2016; MOFFATT et al., 2019).

Tabela 1: Resistência aos antibióticos em *Acinetobacter* spp. realizados por SENTRY (Programa de Vigilância Antimicrobiana) (2001-2010).

Antibióticos	% isolados resistentes/ por período de tempo		
	SENTRY 2001-2004	SENTRY 2006-2009	SENTRY 2008-2010
Amicacina	59.6	51.4	62.6
Cefepime	63.6	55.1	76.6
Ceftazidima	67.6	57.6	81.7
Ciprofloxacina	65.2	66.9	87.2
Colistina	-	0.9	1.2
Gentamicina	-	-	53.3
Imipenem	13.6	40.3	67.8
Meropenem	16.4	ND	66.1

Fonte: GALES et al., 2006; GALES et al., 2011; GALES et al., 2012

3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICO

3.4.1 Resposta imunológica contra infecções bacteriana extracelular

As infecções causadas por bactéria extracelular, ou seja, que são capazes de se replicar fora das células do hospedeiro; na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais de lumens das vias aéreas e intestinais. Deste modo, os mecanismos de defesa do hospedeiro são principalmente as barreiras naturais, a resposta imune inata e adaptativa (COELHO-CASTELO et al., 2009; GARCIA-PATINO et al., 2017). Dentre essas barreiras naturais estão, epitélio íntegro da pele e mucosas que atua como uma barreira física e impedem a aderência e a penetração de bactérias; movimentos peristálticos, a secreção de muco do trato gastrointestinal, movimentos mucociliar eliminam bactéria do trato respiratório; Ph (suco gástrico) como barreira química, além da saliva e das secreções prostáticas que possuem substancias antimicrobiana. Para as infecções no sistema circulatório, essas são removidas por células fagocitárias (células de Kupffer) do fígado e baço (COELHO-CASTELO et al., 2009; GARCIA-PATINO et al., 2017).

As infecções graves por *A. baumannii* podem ser observadas principalmente em indivíduos imunocomprometidos, por outro lado, comumente não apresenta ameaça a indivíduos imunologicamente saudáveis (HARRIS et al., 2013; BRUHN et al., 2015). O hospedeiro acometido por infecção de *A. baumannii* ativam as respostas imunes inatas provocando interações com os receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs) que são proteínas expressas principalmente em células imunes, assim induz à produção de citocinas e quimiocinas (IL-1, IL-6 e CXCL1) pró-inflamatórias e recrutam efetores imunes para o local (GARCIA-PATINO et al., 2017; WONG et al., 2017; CHEN, 2020).

As PRR mais importantes são receptores do tipo Toll (TLR-2 e TLR-4) ligados a membrana das células do sistema inato do hospedeiro, pois exerce funções de detectar e reconhecer componentes do padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (lipopolissacarídeo (LPS), OMVs, cápsula), e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são os componentes liberados por dano ou morte celular pós infecção (CHEN, 2020). Além disso, resposta imune eficaz contra bactérias extracelulares são mediadas por células T CD4⁺ Th1/Th17, especificamente em mucosas. As T CD4⁺ produzem citocinas que aumentam a fagocitose e atividades bactericidas de neutrófilos e macrófagos, as Th1 contribui para a ativação de macrófagos para aumentar a capacidade fagocitária e a produção de IFN- γ , e Th17 promovem a inflamação local pela liberação de IL-17 e IL-23, bem como o recrutamento de neutrófilos e monócitos (YAN et al., 2016; GARCIA-PATINO et al., 2017).

A IL-17 é uma das citocinas que tem recebido atenção especial no papel da imunidade inata, e por ser produzida abundantemente no pulmão desempenham defesa do hospedeiro contra infecções respiratórias por *A. baumannii* (CHEN, 2020). Embora, essas respostas inatas podem não ser suficientes, mas são importantes para o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra infecções *A. baumannii*, visto que cepas altamente virulentas podem evadir o sistema imunológico para estabelecer infecções. Deste modo, a imunidade humoral, mediada por anticorpos, desempenham importantes mecanismos de eliminação das bactérias extracelulares.

A imunidade adaptativa sob influência da resposta imunes inata, que exerce a função de apresentação efetiva de antígenos e produção de citocinas, incluindo as IL-12, CD40L, IL-1, IFNs tipo I e TNF- α , além de orientar a diferenciação e o desenvolvimento de células T e respostas de anticorpos (CHEN et al., 2020). Assim como em outras infecções provocadas por bactérias extracelulares, as células B e os anticorpos desempenham importantes papéis na defesa do hospedeiro contra infecção por *A. baumannii*. Verificado por dados clínicos e experimentais reforçam essa hipótese. Pacientes com infecção por esse patógeno desenvolveram altos títulos de respostas séricas específicas de IgM, IgA e IgG (ISLAM et al., 2011). Além disso foi verificado que respostas imunes Th2 assumem um importante papel na proteção, uma vez que são correlacionados a títulos de anticorpos específicos de *A. baumannii*, e também transferência de soro de camundongos imune confere proteção contra *A. baumannii* (LUO et al., 2012).

3.4.2 Avaliação de formulações vacinais em modelos murinos

O desenvolvimento de vacinas como estratégia imunológica, uma abordagem alternativa que difere dos antibióticos, pode ser uma opção profilática a grupos vulneráveis, como pacientes imunocomprometidos, soldados e idosos, a infecções potencialmente fatais de *A. baumannii* resistência a múltiplos medicamentos (MDR), uma vez que a aquisição de resistência a diversas classes de antibióticos dificulta a conduta terapêutica (MA e CHEN et al., 2021). Modelos murinos contribuem na avaliação de imunogenicidade de vacinas, ou seja, a capacidade de induzir imunidade de forma específica e eficaz contra infecções por *A. baumannii* (HARRIS et al., 2013; McCONNELL; ACTIS; PACHON 2013; RAMEZANALIZADEH et al., 2020).

Vários estudos com vacinas mostraram efeito protetor eficaz no controle de infecções por *A. baumannii* com diferentes abordagens. As vacinas foram desenvolvidas em dois principais grupos: (i) grupo que inclui vacinas compartmentais, por exemplo, células inteiras inativadas com formalina ou radiação, vesículas de membrana externa (OMV), e complexo de

membrana externa (OMC), e (ii) grupo contém proteínas recombinantes, que incluem vacinas de subunidades (MA e CHEN et al., 2021).

Dados experimentais em camundongos observados em diversas pesquisas apoiam a hipótese da influência dos anticorpos na proteção do hospedeiro contra *A. baumannii*. Então, a imunização com formulação vacinal de células inteiras inativadas de *A. baumannii* produziu resposta robusta de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2c específicos contra *A. baumannii* e reduziu significativamente cargas bacterianas pós-infecção e os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (MCCONNELL e PACHÓN 2010).

Shu et al., (2016), demonstrou que uma vacina de células inteiras inativadas estimulou a produção de altos níveis de anticorpos IgG séricos capazes de reconhecer a cepa MDR *A. baumannii* usada como antígeno. Comprovou em outro estudo que a imunização de células inteiras deficiente em LPS é capaz de fornecer proteção após infecção com duas cepas *A. baumannii* contendo LPS, indicando que a resposta imune induzida é suficiente para reconhecer antígenos em sua conformação nativa (GARCÍA-QUINTANILLA et al., 2014). Também foi demonstrado em camundongos efeito protetor de uma vacina de complexo de membrana externa contra *A. baumannii* resistente a múltiplas drogas (ISLAM et al., 2011; PULIDO et al., 2018). Diferente abordagem foi verificada por Luo (2012), a imunização com proteína recombinante (OmpA) melhorou significativamente a sobrevivência induziu altos títulos de anticorpos anti-OmpA e reduziu a carga bacteriana tecidual em camundongos infectados.

3.5 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de infecções hospitalares representa um desafio significativo para a saúde pública tanto no Brasil quanto no mundo. A falta de estudos completos que investiguem dados epidemiológicos e microbiológicos dificulta uma compreensão precisa da extensão desse problema em diferentes regiões, incluindo a região norte do Brasil. As bactérias responsáveis por essas infecções e sua crescente resistência a múltiplas classes de antimicrobianos é de extrema importância, devido ao impacto significativo na morbimortalidade dos pacientes e aos custos adicionais elevados no tratamento.

Os casos frequentes de infecções hospitalares causadas por essas bactérias representam um desafio clínico, especialmente para pacientes imunocomprometidos, sendo considerados graves e contribuindo para a dificuldade no controle. Dentre as bactérias mais relevantes na ocorrência de surtos em unidades de terapia intensiva (UTIs) em diversos países da América Latina, América do Norte e Europa, destaca-se a bactéria do gênero *Acinetobacter* sp.. Isso se deve à sua presença em diversos ambientes como equipamentos hospitalares, utensílios

médicos e leitos hospitalares, esse gênero é capaz de abrigar genes de resistência e disseminá-los por meio de elementos móveis presentes em seu genoma. É importante ressaltar que a rápida disseminação desses genes de resistência pode agravar a situação.

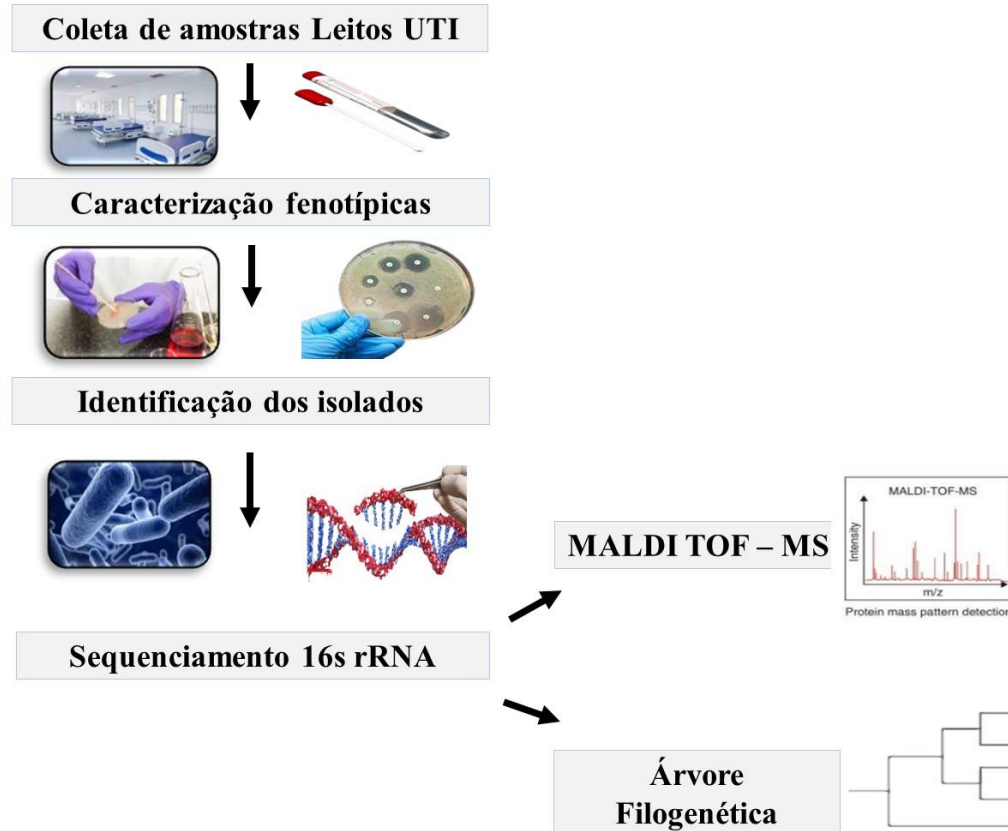
No âmbito da assistência à saúde, é relevante mencionar que o município de Gurupi-TO possui um Hospital Regional Geral (HRG), destinado ao atendimento de adultos e crianças, que oferece serviços de média e alta complexidade pelo Sistema Único de Saúde (SUS) a 18 municípios da região Sul do estado Tocantins. Dessa forma, essa instituição desempenha um papel de extrema importância como unidade de saúde, proporcionando um fluxo significativo de atendimento e uma ocupação elevada de leitos em todas as suas clínicas, especialmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Levando em conta esse fluxo, essa instalação de cuidados de saúde apresenta vulnerabilidade à ocorrência de infecções hospitalares, sendo assim, o monitoramento e a caracterização dos agentes infecciosos podem ser estratégicos para o estado. A identificação dos isolados oriundos de unidade de terapia intensiva do hospital do sul do Tocantins trará uma visão ampliada sobre o perfil de suscetibilidade, e os determinantes gênicos de resistência.

Diante do desafio que representa para a saúde pública, torna-se essencial adotar abordagens inovadoras no tratamento dessas infecções. Nesse sentido, é de extrema importância realizar uma análise aprofundada do papel das vacinas na prevenção e combate às bactérias resistentes a antibióticos. A compreensão dos fatores de virulência e dos mecanismos moleculares da patogênese da infecção por *A. baumannii* ainda é limitada, o que representa um obstáculo para o desenvolvimento bem sucedido de vacinas direcionadas a esse agente patogênico. Apesar de ainda não haver uma vacina licenciada e disponível comercialmente para esse patógeno, existem intensos esforços científicos e técnicos voltados para o desenvolvimento de uma vacina potencialmente eficaz contra *A. baumannii*. Considerando as circunstâncias, buscou neste trabalho uma estratégia vacinal que visa reduzir a utilização de antimicrobianos no controle de infecções por *A. baumannii* (MDR), por meio da indução e fortalecimento do sistema imunológico em modelo experimental imunocomprometidos.

A pesquisa que abrange este trabalho de tese teve início em 2019 com um projeto de pesquisa “*Análises da susceptibilidade a antibióticos de bactérias isoladas de unidade terapia intensiva (UTI) de hospital regional do estado do Tocantins*”, aprovado no edital do PPSUS com eixo temático Epidemiologia e vigilância em saúde. Paralelamente, e de forma complementar, foi conduzido outro estudo com objetivo no desenvolvimento de um produto alternativo contra infecções de bactéria multirresistentes, avaliado em modelos murinos. As instituições parceiras para execução desses projetos, ILMD – Fiocruz Amazônia e Secretaria Estadual de Saúde do Estado Tocantins.

3.6 FLUXO METODOLÓGICO

Cap. I – Caracterização Bactéria MDR



Cap. II – Desenvolvimento vacinal contra bactéria MDR

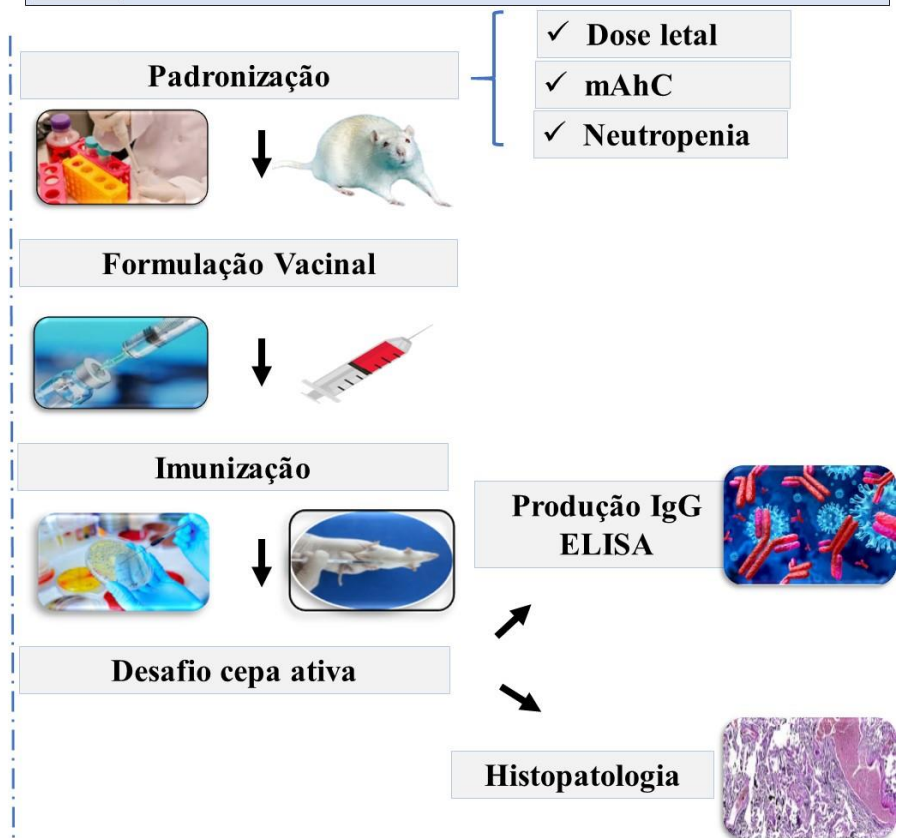


Figura 5: Esquema metodológico do trabalho de tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, T.; ALI, I.; KHAN, N. A.; HAN, B.; GAO, J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases BioMed Research International. **Hindawi Limited**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>

ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980

ARBAB, S.; ULLAH, H.; WEI, X.; WANG, W.; AHMAD, S.U.; ZHANG, J. Drug resistance and susceptibility testing of Gram-negative bacterial isolates from healthy cattle with different β -Lactam resistance Phenotypes from Shandong province China. **Brazilian Journal of Biology**, v.83, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.247061>

ASIF, M.; ALVI, I.A.; REHMAN, S.U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1249, 2018. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>

BAKHEET, T.M.; DOIG, A.J. Properties and identification of antibiotic drug targets. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-195>

BAUMANN P, DOUDOROFF M, STANIER RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol**, v. 95, n. 5 , p. 1520-41, 1968. <https://doi.org/10.1128/jb.95.5.1520-1541.1968>

BEIJERINCK, M.W. Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. **Centr Bakteriolog Parasitenk Abt**, v. 29, p .167-76, 1911.

BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M.J. Principles and practice of infectious diseases E-book. **Elsevier Health Sciences**; 2019.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.

BILLIPS, B.K.; YAGGIE, R.E.; CASHY, J.P.; SCHAEFFER, A.J.; KLUMPP, D. J. A live-attenuated vaccine for the treatment of urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. **J Infect Dis**. v. 200, n. 2, p.263–272, 2009. <https://doi.org/10.1086/599839>

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1549-1554, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.01794-09>

- BOGATY, C., MATASEJE, L., GRAY, A., LEFEBVRE, B., LÉVESQUE, S., MULVEY, M., LONGTIN, Y. Investigation of a Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.7, pp.1-7, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0437-7>
- BONNIN, R.A.; POTRON, A.; POIREL, L.; LECUYER H.; NERI, R.; NORDMANN, P. PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 55, n. 5, p. 2424-2427, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.01795-10>
- BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, p.49-56, 2006. <https://doi.org/10.1086/504477>
- BOU, G.; CERVERO, G.; DOMINGUEZ, M. A.; QUEREDA, C.; MARTINEZ-BELTRAN, J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect.**, v. 6, n. 12, p. 635-43, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00181.x>
- BRAGA, I. A.; CAMPOS, P. A. D.; BATISTÃO, D. W. D. F.; GONTIJO FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Using point prevalence survey to define burden of antimicrobial use among 35 adult intensive care units in Brazil. **Infectious Diseases**, v. 51, n. 6, p. 459-462, 2019. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1581371>
- BRAGA, I. A.; CAMPOS, P. A.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 318-324, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>
- BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 1–3, 2006. <https://doi.org/10.1093/jac/dki425>
- BRUHN, K. W.; PANTAPALANGKOOR, P.; NIELSEN, T.; TAN, B.; JUNUS, J.; HUJER, K. M. Host fate is rapidly determined by innate effector-microbial interactions during *Acinetobacter baumannii* bacteremia. **J. Infect. Dis.** v. 11, p. 1296–1305, 2015. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu593>
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- CASTILHO, S. R. A.; GODOY, C. S. D. M.; GUILARDE, A. O.; CARDOSO, J. L.; ANDRÉ, M. C. P.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS One**, v. 12, article e0176790, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>

CATALANO, M.; QUELLE, L.S.; JERIC, P.E.; DI MARTINO, A.; MAIMONE, S.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. **Journal of Hospital Infection**, v.42, n.1, p 27-35, 1999. <https://doi.org/10.1053/jhin.1998.0535>

CHAKRAVARTY, B. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges and future prospects. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5 p. 4037-4046, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05389-4>

CHEAH, S. E.; JOHNSON, M. D.; ZHU, Y.; TSUJI, B. T.; FORREST, A.; BULITTA, J. B.; LI, J. Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. **Scientific Reports**, v.6, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep26233>

CHEN, C. H.; LIN, L. C.; CHANG, Y. J.; CHEN, Y. M. CHANG, C. Y.; HUANG, C. C. Infection control programs and antibiotic control programs to limit transmission of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* infections: evolution of old problems and new challenges for institutes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 8, p. 8871-8882, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808871>

CHEN, W. Host innate immune responses to *Acinetobacter baumannii* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 486, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00486>

CHOI, CH.; LEE, J.S.; LEE, Y.C.; PARK, TI.; LEE, J.C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiol**, v.8, p. 216, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-216>

CLEMMER, K.M.; BONOMO, R. A.; RATHER, P. N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**, v. 157, p. 2534-2544, 2011. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049791-0>

COELHO-CASTELO, A. A.; TROMBONE, A. P.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v42i2p127-142>

COSGAYA C. C.; MARÍ A. M.; VAN A. A.; FERNÁNDEZ-ORTH, D.; MOSQUEDA, N.; T. M.; VILA E. J. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a new member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016, 2016.

COSTA, D. M.; JOHANI, K., MELO, D. S.; LOPES, L. K. O.; LOPES L. L. K. O.; TIPPLE, A. F. V.; VICKERY, K. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 4, p. 269-276. 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13127>

- CROXATTO, A., PROD'HOM, G., GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- DIEKEMA, D. J.; HSUEH, P. R.; MENDES, R. E.; PFALLER, M. A.; ROLSTON, K. V.; SADER, H. S.; JONES, R. N. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. e00355-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/AAC.00355-19>
- DIJKSHOORN L, NEMEC A, SEIFERT H. An increasing threat in hospitals multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 12, p. 939-951. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- DRAWZ, S.M.; BONOMO, R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Ver**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- DUBOIS, D.; GRARE, M.; PRERE, M. F.; SEGONDS, C.; MARTY, N.; OSWALD, E. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, JCM-00343, 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.00343-12>
- DZIDIC, S.; BEDEKOVIĆ, V.; Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 6, p. 519-526, 2003.
- ELIOPOULOS, G. M.; MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254-126, 2008. <https://doi.org/10.1086/529198>
- ESPINAL, P.; FUGAZZA, G.; LOPEZ, Y.; KASMA, M.; LERMAN, Y.; MALHOTRA-KUMAR, S.; GOOSENS, H.; CARMELI, Y.; VILA, J. Dissemination of the NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 55, n. 11, p. 5396–5398. 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.00679-11>
- ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **IJAMBR**, v. 4, p. 90–101, 2016.
- EVANS, B. A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. The Rise of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, n.2, p. 223-238, 2013. <https://doi.org/10.2174/138161213804070285>
- FERREIRA, R.L.; DA SILVA, B.C.; REZENDE, G.S.; NAKAMURA-SILVA, R.; PITONDO-SILVA, A.; CAMPANINI, E.B.; PRANCHEVICIUS, M.C.D.S. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3198, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03198>
- FONSECA, A.D.S.; MENCALHA, A.L.; PAOLI, F. Antimicrobial photodynamic therapy against *Acinetobacter baumannii*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102430, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102430>

FOURNIER, P.E.; RICHET, H.; WEINSTEIN, R.A. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical infectious diseases**. v. 42, n. 5, p. 692-9, 2006. <https://doi.org/10.1086/500202>

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). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 2070-2074, 2011. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr239>

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clin Microbiol Infect**, v.12, n. 4, p. 315-321, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x>

GARCIA-PATINO, M. G.; GARCIA-CONTRERAS, R.; AND LICONA-LIMON, P. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. **Front. Immunol.** v. 8, p. 441. 2017 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00441>

GARCÍA-QUINTANILLA, M., PULIDO, M.R., PACHÓN, J., MCCONNELL, M.J. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. **PLoS One**, v. 9, article e114410, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114410>

GERNER-SMIDT, P., TJERNBERG, I., URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 2, p. 277-282, 1991. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.277-282.1991>

GETCHELL-WHITE S.I.; DONOWITZ L.G.; GROSCHEL D.H. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infection Control e amp, Hospital Epidemiology**. v. 10 n.9, p. 402-7. 1989. <https://doi.org/10.2307/30144208>

GIRIJA, S.A.; PRIYADHARSINI, J.V.; PARAMASIVAM, A. Prevalence of carbapenemhydrolyzing OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* in patients with severe urinary tract infection. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 67, n.1 p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.030>

GUNDI, V.A.; DIJKSHOORN, L.; BURIGNAT, S.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiology**, n.155, p. 2333-41, 2009. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026054-0>

- HAEGGMAN, S.; LOFDAHL, S.; PAAUW, A.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.7, p. 2400-2408, 2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2400-2408.2004>
- HAQUE, M.; SARTELLI, M.; MCKIMM, J.; BAKAR, M.A. Health care-associated infections—an overview. **Infection and drug resistance**, v.11, p. 2321, 2018. <https://doi.org/10.2147/IDR.S177247>
- HARRIS, G.; KUO LEE, R.; LAM, C. K.; KANZAKI, G.; PATEL, G. B.; XU, H. H.; A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 57, n. 8, p. 3601–3613, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.00944-13>
- HE, S.; HE, H.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; WANG, W.; YU, D. In vitro and in vivo analysis of antimicrobial agents alone and in combination against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 507, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00507>
- HOU, C.; YANG, F. Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 and blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 8, p. 13859, 2015.
- HOUANG, E.T.; CHU, Y.W.; LEUNG, C.M.; CHU, K.Y.; BERLAU, J.; NG, K.C.; CHENG, A.F. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter spp.* in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 228-34, 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.228-234.2001>
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol**, v. 51, p. 72-80, 2019.
- IBRAHIM, S.; AL-SARYI, N.; AL-KADMY, I.A.M.P.; AZIZ, S.N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular biology reports**, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- ISLAM, A. H. M.S.; SINGH, K.K. B.; ISMAIL, A. Demonstration of an outer membrane protein that is antigenically specific for *Acinetobacter baumannii*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 69, n. 1, p. 38-44, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.008>
- JAIN, M.; SHARMA, A.; SEN, M.K.; RANI, V.; GAIND, R.; SURI, J. C. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates causing lower respiratory infections among ICU patients. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 75-81. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.023>
- JAIN, R.; DANZIGER, L.H. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. **Annals of Pharmacotherapy**. v. 38, n. 9, p. 1449-59, 2004. <https://doi.org/10.1345/aph.1D592>

JANG, T.N.; LEE, S.H.; HUANG, C.H.; LEE, C.L.; CHEN, W.Y. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. **Journal of hospital infection**, v.73, n. 2, p. 143-50, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.06.007>

JEON, J.; RYU, C.M.; LEE, J. Y.; PARK, J. H.; YONG, D.; LEE, K. In vivo application of bacteriophage as a potential therapeutic agent to control OXA-66-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to sequence type 357. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 82, p. 4200–4208, 2016. <https://doi.org/10.1128/AEM.00526-16>

JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical microbiology and infection**. v.11, n. 11, p. 868-73, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x>

JOSHI, S. G.; LITAKE, G.M. *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public health. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 25-36, 2013. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v3.i3.25>

KAMOLVIT, W.; HIGGINS, P.G.; PATERSON, D.L.; SEIFERT, H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 4, p. 959-963, 2014. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt480>

KARAH, N.; SUNDSFJORD, A.; TOWNER, K.; SAMUELSEN, Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 4, p. 237-247, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>

KHAN, H.A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER P. Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis**. 9(3):216- 24. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000300004>

KIM, U. J.; KIM, H. K.; AN, J. H.; CHO, S. K.; PARK, K. H.; JANG, H. C. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam medical journal**, v. 50, n. 2, p. 37-44, 2014. <https://doi.org/10.4068/cmj.2014.50.2.37>

KOBS, V. C.; FERREIRA, J. A.; BOBROWICZ, T. A.; FERREIRA, L. E.; DEGLMANN, R. C.; WESTPHAL, G. A.; FRANÇA, P. H. C. D. The role of the genetic elements *bla_{oxa}* and *ISAba1* in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, p.433-440, 2016. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0002-2016>

KOLLEF, M.H.; TORRES, A.; SHORR, A.F.; MARTIN-LOECHES, I.; MICEK, S.T. Nosocomial infection. **Critical care medicine**, v. 49, n. 2, p. 169-187, 2021. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004783>

- KURIHARA, M. N. L., SALES, R. O. D., SILVA, K. E. D., SILVA, G. D., MANSANO, M. C. T., MAHMOUD, F. F., SIMIONATTO, S. High lethality rate of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Units of a Brazilian hospital: An epidemiologic surveillance study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0529-2021>
- KYRIAKIDIS, I.; VASILEIOU, E.; PANA, Z. D.; TRAGIANNIDIS, A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, v. 10, n.3, p. 373. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- LABARCA, J. A.; SALLES, M. J. C.; 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. 276-292, 2016. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>
- 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. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 7, p. 55, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
- LEE, Y.; KIM, C. K.; LEE, H.; JEONG, S. H.; YONG, D.; LEE, K. A novel insertion sequence, ISAb₁₀, inserted into ISAb₁ adjacent to the blaOXA-23 gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 361-363, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.01672-09>
- LIMA, L.; SILVA, B.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **Eur J Med Chem**, v. 208, p. 1-40. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- LIN, M.F.; LAN, C.Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 12, p. 787–814, 2014. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>
- LIU, J.Y.; DICKTER, J.K. Nosocomial infections: a history of hospital-acquired infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 637-652, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.001>
- LIU, Q.; LI, W.; DU, X.; LI, W.; ZHONG, T.; TANG, Y.; XIE, Y. Risk and prognostic factors for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia: a retrospective study in a tertiary hospital of West China. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130701, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130701>
- LUO, G.; LIN, L.; IBRAHIM, A.S.; BAQUIR, B.; PANTAPALANGKOOR, P.; BONOMO, R.A.; SPELLBERG, B. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. **PloS one**, v. 7, article e29446, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029446>

- MA, C.; CHEN, W. Where are we and how far is there to go in the development of an *Acinetobacter* vaccine?. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 3, p. 281-295, 2021. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1887735>
- MA, C.; MCCLEAN, S. Mapping global prevalence of *Acinetobacter baumannii* and recent vaccine development to tackle it. **Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 570, 2021. . <https://doi.org/10.3390/vaccines9060570>
- MAHGOUB, S.; AHMED, J.; GLATT, A.E. Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. **American journal of infection control**, v. 30, n. 7, p. 386-90, 2002. <https://doi.org/10.1067/mic.2002.122648>
- MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00376-11>
- MATHAI, A.S.; OBEROI, A.; MADHAVAN, S.; KAUR, P. *Acinetobacter* infections in a tertiary level intensive care unit in northern India: Epidemiology, clinical profiles and outcomes. **Journal of infection and public health**. v. 5, n. 2, p. 145-52, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.12.002>
- McCONNELL, M.J., PACHÓN, J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. **Vaccine**, v. 29, pp. 1-5, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.052>
- McCONNELL. M.J.; ACTIS, L.; PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 37, p. 130–155, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>
- MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; BOYCE, J.D. Mechanisms of polymyxin resistance. Polymyxin Antibiotics: **From Laboratory Bench to Bedside**, p. 55-71, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5
- MUNIER, A. L., BIARD, L., LEGRAND, M., ROUSSEAU, C., LAFAURIE, M., DONAY, J. L., MOLINA, J. M. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. **International J. Infect. Dis.**, 79, pp. 179-184, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.371>
- SETHUVEL, D. P. M., RAGUPATHI, N. K. D., BAKTHAVATCHALAM, Y. D., VIJAYAKUMAR, S., VARGHESE, R., SHANKAR, C., BALAJI, V. Current strategy for local-to global-level molecular epidemiological characterisation of global antimicrobial resistance surveillance system pathogens. **Indian journal of medical microbiology**, v.37, n° 2, pp. 147-162, 2019. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_396

NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T.; DESCHAGHT, P.; PASSET V. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Res Microbiol.**, v.162, n°4, p.393-404, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006>

NICOLAU, D. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opin Pharmacother**, v. 9, p. 23- 37, 2007. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.1.23>

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61-74, 2016. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0009>

NTUSI, N. B.; BADRI, M.; KHALFEY, H.; WHITELAW, A.; OLIVER, S.; PIERCY, J.; DHEDA, K. ICU-associated *Acinetobacter baumannii* colonisation/infection in a high HIV-prevalence resource-poor setting. **PloS one**, v.7, n.12, e52452, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052452>

O'DONNELL, J. NICHOLAS; PUTRA, VIBERT; LODISE, THOMAS P. Treatment of patients with serious infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: How viable are the current options?. Pharmacotherapy: **The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 41, n. 9, p. 762-780, 2021. <https://doi.org/10.1002/phar.2607>

PEERAYEH, S.N.; KARMOSTAJI, A. Molecular identification of resistance determinants, integrons and genetic relatedness of extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in Tehran, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 7, 2015. <https://doi.org/10.5812/jjm.27021v2>

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 538-582, 2008. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>

PELEG, A.Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>

PENWELL, W. F.; ARIVETT, B. A.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* entA Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence. **Plos One**, v. 7, n.5, article e36493, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036493>

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. 3471-3484, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>

POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J.D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-betalamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p.891-897, 2000. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.891-897.2000>

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 24–38 v. 54, p. 24-38, 2010. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>

PULIDO, M. R., GARCÍA-QUINTANILLA, M., PACHÓN, J., & MCCONNELL, M. J. A Lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. **Vaccine**, v. 38, pp. 719-724, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.043>

RAHAL J.J.; URBAN C. *Acinetobacter*. **Semin Respir Crit Care Med**. v. 21, n. 4, p. 341-8. 2000. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9858>.

RAMEZANALIZADEH, F.; OWLIA, P.; RASOOLI, I. Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*. **Vaccine**, v. 38, pp. 5436-5446, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.052>

RANJBAR, R.; FARAHANI, A. Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0612-5>

REDI, D.; RAFFAELLI, C.S.; ROSSETTI, B.; DE LUCA, A.; MONTAGNANI, F. *Staphylococcus aureus* vaccine preclinical and clinical development: current state of the art. **New Microbiol**. v. 41, n. 3, p. 208–213, 2018.

REINALDO, A. R. G.; JÚNIOR, I. L. A.; DE ARAÚJO FILHO, J. C. W.; DE SOUSA, M. N. A. Infecções relacionadas à assistência à saúde em unidades de terapia intensiva. **J Med Health Promot**, v. 2, n. 2, p. 544-555, 2017.

RIBEIRO, A. Como os Antimicrobianos são Classificados. Farmacêutico Digital, <https://farmaceuticodigital.com/2018/06/como-os-antimicrobianos-sao-classificados.html> (Consultado a 25/07/2022), 2018.

RILEY, T.V.; LYRAS, D.; DOUCE, G.R. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. **Vaccine**. v. 37, n. 50, p 7300–730, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.052>

RUMBO, C.; TOMAS, M.; FERNANDEZ, M.E.; SAORES, N.C.; CARVAJAL, M.; SANTILLANA, E. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. **Infect. Immun**. v. 82, p. 4666–4680, 2011. <https://doi.org/10.1128/IAI.02034-14>

SAALFELD S. S. M.; VIANA, G. F.; SIQUEIRA, V. D.; CARDOSO, C. L.; GARCIA, L. B.; TOGNIM, M. B. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.72. n. 4, p. 365-368, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.004>

SADEGHIFARD, N.; SALARI M.H.; GHASSEMI, M.R.; ESHRAGHI, S.; AMIN, H. F. The incidence of nosocomial toxigenic *Clostridium difficile* associated diarrhea in Tehran tertiary medical centers. **Acta Med Iran**, v. 48, n. 5, p.320–32. 2010.

SAMAHA-KFOURY, J. N. Recent developments in lactamases and extended spectrum lactamases. **BMJ**, v. 327, n. 7425, p. 1209–1213, 2003. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7425.1209>

SELASI, G. N. Differences in Biofilm Mass, Expression of Biofilm-Associated Genes, and Resistance to Desiccation between Epidemic and Sporadic Clones of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 191. **Plos One**, v.13, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162576>

SILVA, E.; DALFIOR JUNIOR, L.; FERNANDES, H. D. S.; MORENO, R.; VINCENT, J.L. Prevalence and outcomes of infections in Brazilian ICUs: a subanalysis of EPIC II study. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, p. 143-150, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2012000200008>

SILVA, K. E.; MACIEL, W. G.; CRODA, J., CAYÔ, R., RAMOS, A. C., DE SALES, R. O.; SIMIONATTO, S. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. **PLoS One**, v. 13, n. 12, e0209367, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209367>

SMET, A.; COOLS, P.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; HAESBROUCK, F.; KEMPF, M.; NEMEC, A.; VANECHOUTTE, M. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4007-4015, 2014. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.068791-0>

TACCONE, F. S.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; DE BACKER, D.; DE MOOR, V.; DEVIÈRE, J.; VINCENT, J. L.; JACOBS, F. Successful treatment of septic shock due to pan-resistant *Acinetobacter baumannii* using combined antimicrobial therapy including tigecycline. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 257-260, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0123-1>

THEURETZBACHER, U.; BUSH, K.; HARBARTH, S.; PAUL, M.; REX, J.H.; TACCONELLI, E.; THWAITES, G. E. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 286-298, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0340-0>

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENSO, C. K.; HIRVONEN, V. H.; TAKEBAYASHI, Y.; SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>

- TOUCHON, M.; CURY, J.; YOON, E. J.; KRIZOVA, L.; CERQUEIRA, G. C.; MURPHY, C.; ROCHA, E. P. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 10, p. 2866-2882, 2014. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu225>
- TOWNER, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 355-363, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>
- TRAGLIA, G.M.; QUINN, B.; SCHRAMM, S.T.; SOLER-BISTUE, A. RAMIREZ M. S. Serum Albumin and Ca²⁺ Are Natural Competence Inducers in the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 60, p. 4920–4929, 2016. <https://doi.org/10.1128/AAC.00529-16>
- TSAKRIS, A.; IKONOMIDIS, A.; POULOU, A.; SPANAKIS, N.; VRIZAS, D.; DIOMIDOUS, M.; POURNARAS, S.; MARKOU, F. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 6, p. 588-594, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01996.x>
- VALENCIA, R.; ARROYO, L.A.; CONDE M.; ALDANA, J.M.; TORRES, M.J.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, n. 3, p. 257-263, 2009. <https://doi.org/doi:10.1086/595977>
- VAN LOOVEREN, M.; GOOSENS, H.; ARPAC STEERING GROUP. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp.* in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 8, p. 684– 704, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00942.x>
- VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **R bras ci Saúde**, v.19, n. 2, p. 151-156, 2015. <https://doi.org/10.4034/RBCS.2015.19.02.10>
- VILA, J.; MARTI, S.; SANCHEZ-C´ESPEDES J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 6, p. 1210– 1215, 2007. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl509>
- WANG, J.; RUAN, Z.; FENG, Y.; FU, Y.; JIANG, Y.; WANG, H.; YU, Y. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. **PLoS One**, v. 9, n. 8, article e104882, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104882>
- WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v. 12, pp. 3-7, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00085-0)
- WONG, D.; NIELSEN, T. B.; BONOMO, R. A.; PANTAPALANGKOOR, P.; LUNA, B.; SPELLBERG, B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
- WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J.; COELHO, J. M.; TURTON, J. F.; WARD, M. E.; BROWN, S.; LIVERMORE, D. M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA

carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 4, p. 351, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. 2017 (accesado 05 AGO 2022).

YAN, Z.; YANG, J.; HU, R.; HU, X.; CHEN, K. *Acinetobacter baumannii* infection and IL-17 mediated immunity. **Mediators Inflamm.** v. 2016, 98340202016. <https://doi.org/10.1155/2016/9834020>

YANG, Q.; RUI, Y. Two multiplex real-time PCR assays to detect and differentiate *Acinetobacter baumannii* and non-Baumannii *Acinetobacter* spp. carrying bla NDM, bla OXA-23-like, bla OXA-40-like, bla OXA-51-like, and bla OXA-58-like genes. **PloS one**, v. 11, article e0158958, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158958>

ZAIDI, T.S.; PRIEBE, G.P.; PIER, G.B. A live-attenuated pseudomonas aeruginosa vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection. **Infect Immun.** v. 74, n. 2, p. 975–983, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.975-983.2006>

ZHANEL, G., WIEBE, R., DILAY, L., THOMSON, K., RUBINSTEIN, E., HOBAN, D., NOREDDIN, A., AND KARLOWSKY, J. Comparative Review of the Carbapenems. **Drugs**, v. 67, p. 1027-1052, 2007. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>

ZHANG, X.; LI, F.; AWAN, F.; JIANG, H.; ZENG, Z.; LV, W. Molecular epidemiology and clone transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in ICU rooms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 633817, 2021. <https://doi.org/10.1086/599839>

ZIMBLER, D. L.; PENWELL, W. F.; GADDY, J. A.; MENKE, S. M.; TOMARAS, A. P.; CONNERLY, P. L.; ACTIS, L. A. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Biometals**, v. 22, n. 1, p. 23-32, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9202-3>

Artigo - Brazilian Journal of Biology |Qualis: A3 | Fator de impacto 1.65
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.269778>

Resistance determinants of emerging pathogens isolated from an intensive care unit as a parameter of population health conditions of the Legal Amazon microregion

ABSTRACT

Bacteria responsible for causing infections are common in hospital environments, water, soil, and food products. The infection risk is intensified by the absence of public sanitation, poor quality of life, and food scarcity. These external factors promote the dissemination of pathogens by direct contamination or biofilm formation. In this work, we identified bacterial isolates obtained from intensive care units in the southern region of Tocantins, Brazil. We compared matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) techniques and 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) molecular analysis; we also performed phenotypic characterization. Fifty-six isolates characterized using morphotinctorial tests were classified as gram-positive (80.4%; n = 45) and gram-negative (19.6%; n = 11) and were resistant to several antibiotic classes; notably, we identified the *bla*_{OXA-23} resistance gene in the ILH10 isolate. Microbial identification using MALDI-TOF MS resulted in the identification of *Sphingomonas paucimobilis* and *Bacillus circulans*. 16S rRNA sequencing revealed four isolates belonging to the genera *Bacillus* and *Acinetobacter*. The similarity was superior to 99% for *Acinetobacter schindleri* in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), grouped in the clade superior to 90%. Several strains isolated from intensive care units (ICU) were resistant to various antibiotic classes. These techniques allowed for the identification of several microorganisms of importance in public health, enabling improvements in human infection control and proving the quality of inputs, food, and water.

Keywords: Multi-drug resistant bacteria, hospital environment, MALDI-TOF MS, 16S rRNA

Determinantes de resistência a patógenos emergentes isolados de uma unidade de terapia intensiva como parâmetro das condições de saúde da população da microrregião da amazônia legal.

RESUMO

As bactérias responsáveis por causar infecções são comuns em ambientes hospitalares, água, solo e produtos alimentícios. O risco de infecção é intensificado pela ausência de saneamento público, má qualidade de vida e escassez de alimentos. Esses fatores externos promovem a disseminação de patógenos por contaminação direta ou formação de biofilme. Neste trabalho, identificamos isolados bacterianos obtidos de unidades de terapia intensiva na região sul do Tocantins, Brasil. Comparamos técnicas de espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e análise molecular de ácido ribonucleico ribossômico 16S (rRNA); também realizamos caracterização fenotípica. Cinquenta e seis isolados caracterizados por testes morfotintoriais foram classificados como gram-positivos (80,3%; n = 45) e gram-negativos (19,6%; n = 11) e foram resistentes a várias classes de antibióticos; notavelmente, identificamos o gene de resistência *bla*_{OXA-23} no isolado de ILH10. A identificação microbiana usando MALDI-TOF MS resultou na identificação de *Sphingomonas paucimobilis* e *Bacillus circulans*. O sequenciamento do 16S rRNA revelou quatro isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter*. A similaridade foi superior a 99% para *Acinetobacter schindleri* no BLAST, agrupado no clado superior a 90%. Várias cepas isoladas de ICU foram resistentes a várias classes de antibióticos. Essas técnicas permitiram a identificação de diversos microrganismos de importância em saúde pública, possibilitando melhorias no controle de infecções humanas e comprovando a qualidade dos insumos, alimentos e água.

Palavras-chave: bactéria multirresistente, ambiente hospitalar, MALDI-TOF MS, 16S rRNA.

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas dentro e fora dos ambientes hospitalares são as principais causas de adoecimento. O uso excessivo de agentes antimicrobianos em humanos e animais domésticos tem gerado altas taxas de resistência bacteriana e se tornou um problema grave em todo o mundo (BONELLI et al., 2014; MORETTO et al., 2022). Fatores comunitários e ambientais contribuem para o surgimento de bactérias multirresistentes, promovidas pela falta de saneamento público adequado e pela transmissão de efluentes domésticos aos mananciais. Esses fenômenos contribuem para a disseminação de patógenos, principalmente em regiões com baixos índices de desenvolvimento humano (GALLINI et al., 2010; BARTLEY et al., 2019; MORETTO et al., 2022).

O surgimento de novos mecanismos de resistência pode surgir em comunidades vulneráveis, levando à disseminação de genes bacterianos via plasmídeos conjugativos (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002, CERCEO et al., 2016). Entre as bactérias multirresistentes primárias (MDRs), incluindo espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e enterobactérias que são comumente encontradas em ambientes hospitalares, água, solo e produtos alimentícios (LOGAN 2012; SMET et al. 2014; FERREIRA et al. 2019; ARBAB et al. 2021; ADWAN AND OMAR 2021). A comida é uma fonte potencial de transmissão entre a comunidade e ambientes clínicos (CAVALHEIRA et al. 2021).

Outro fator crítico é a capacidade das bactérias de formar uma comunidade estrutural de múltiplas células bacterianas (biofilme) caracterizada por alta versatilidade nutricional e metabólica e aderência a superfícies vivas e não vivas. Essas superfícies incluem vidro, plástico, equipamentos de raios X, bancadas, camas, ventiladores e sistemas de circulação de ar (BERNARDS et al., 2004; GADDY et al., 2009).

A resistência a antibióticos e produtos químicos (desinfetantes) contribui para uma maior patogenicidade (GADDY et al., 2009; NOWAK AND PALUCHOWSKA, 2016). As β -lactamases atuam como um dos principais mecanismos associados à resistência; A resistência a β -lactâmicos é mediada por β -lactamases que inibem antibióticos, incluindo carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As β -lactamases podem ser divididas em classe A [e.g. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase], classe B metalo- β -lactamases [e.g. New Delhi metalo- β -lactamase, verona codificado por integrina, metallo-beta-lactamases, imipenem-resistentes *Pseudomonas*] e classe D β -lactamases [e.g., oxacylinases] (BUSH AND JACOBY, 2010; LOGAN 2012; LEE et al., 2016).

Os métodos convencionais para diagnosticar patógenos envolvem o isolamento do organismo em cultura com posterior análise de suas características fenotípicas (isto é, morfologias microscópicas e macroscópicas) e avaliações bioquímicas em vários substratos. (STĘPIEŃ-PYŚNIAK et al., 2017). Outros métodos utilizados em laboratórios de microbiologia clínica incluem métodos moleculares com sequenciamento de genes de 16S rRNA e 23S rRNA. MALDI-TOF MS é uma técnica de identificação rápida e precisa para bactérias isoladas de espécimes biológicos e pode detectar várias proteínas de espécies microbianas (ANGELETTI, 2017; TSUCHIDA et al., 2020).

A análise da diversidade microbiana em diferentes ambientes e o perfil de bactérias multirresistentes têm implicações essenciais para os hospitais decorrentes do uso indiscriminado de antibióticos. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente fontes microbianas em unidades de terapia intensiva (UTIs) e identificar isolados utilizando os métodos moleculares MALDI-TOF MS e 16S rRNA. Essas técnicas são fundamentais para a saúde pública, pois proporcionam ações de controle de infecções humanas e beneficiam a população.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do estudo; Processamento de amostras; Permissões Éticas e Legais.

O Hospital Regional de Gurupi - Tocantins - Brasil (11°43'48" S e 49°04'08" W) está localizado na microrregião da Amazônia Legal. É referência para 18 municípios: Aliança do Tocantins, Araguaçu, Alvorada, Cariri do Tocantins, Crixás do Tocantins, Dueré, Figueirópolis, Formoso do Araguaia, Jau do Tocantins, Lagoa da Confusão, Palmeiropolis, Paranã, Peixe, Sandolândia, São Valério, São Salvador, Sucupira e Talismã. Foram utilizadas amostras de leitos de pacientes internados por mais de 48 horas. A coleta foi realizada com swabs estéreis passados na superfície do leito e transportados em meio Cary Blair. As amostras foram cultivadas em ágar de soja tríptica (Kasvi, Itália) e incubadas aerobiamente a 37 °C durante a noite. Os isolados bacterianos foram fenotipicamente caracterizados usando métodos manuais de coloração de Gram e medindo as propriedades de motilidade, crescimento a 44 °C, utilização de citrato, produção de oxidase e urease e oxidação/fermentação (CASTILHO et al., 2017). O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Tocantins aprovou o trabalho (número do protocolo 72773417.3.0000.5519). Após emissão de parecer fundamentado deste estudo, o

protocolo foi encaminhado à Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (SESAU/TO) em atendimento à portaria SES-391/2017.

2.2 Análise Fenotípica e Classificação de Resistência

Medimos a sensibilidade e resistência a antibióticos usando o método de difusão em disco, seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Os isolados foram cultivados em 100 ml de caldo TSB (peptona de soja 17 g/l, caseína 3 g/l, dextrose 5 g/l e fosfato de potássio monobásico 5 g/l), agitando a 120 rpm a 37 °C por 8 h. O crescimento foi ajustado para 10^8 UFC/ml e semeado em ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Itália) entre 18 e 24 horas de incubação a 37 °C para registro da formação do halo (CASTILHO et al., 2017). Os antibióticos (Sensifar®-Brasil) incluíram ampicilina/sulbactam (20 µg), amicacina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cotrimoxazol (25 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacina (5 µg), linezolida (30 µg), meropenem (10 µg), minociclina (30 µg), norfloxacina (10 µg), piperacilina/tazobactam (110 µg), polimixina B (330 µg UI), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Os dados de inibição do halo foram medidos e classificados, com resistência a ≥ 1 agente antimicrobiano em ≥ 3 categorias antimicrobianas consideradas MDR. A resistência a ≥ 1 agente antimicrobiano em todas as classes de antimicrobianos, exceto duas, foi considerada extensivamente resistente a medicamentos (MAGIORAKOS et al., 2012).

2.3 Análise Molecular e Detecção de Genes

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando primers para OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58 e a sequência de inserção (IS) do ISAbal (SOHRABI et al., 2012) (Tabela 1). A extração de DNA foi realizada com um kit de extração (Invitrogen-PureLink® Genomic DNA Kits). A técnica de PCR foi usada para amplificar os fragmentos com um volume final de 20 µL contendo 20 ng de DNA, 1,5 mM de $MgCl_2$, 250 µM dNTP, 1U Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA) e primer 0,47 µM. As reações foram realizadas em um termociclador (Biocycler MJ96G, Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 4 min; 35 ciclos de desnaturação (90 °C, 30 segundos), alinhamento (50 °C, 40 segundos) e extensão (72 °C, 1 min); extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com

0,5 µg/mL de brometo de etídio e visualizado usando Gel Doc System XR (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Tabela 1. Genes-alvo para amplificação por PCR, tamanho do fragmento e sequências de primers.

Grupo	Genes	Primer sequencia (5'-3')	Temperatura melting (°C)	Tamanho esperado do amplicon (pb)	Referência
β-Lactamases (Classe D)	<i>bla_{Oxa-23}F</i>	GATGTGTCATAGTATTCGT CGT	50	1,057	Sohrabi et al. (2012)
	<i>bla_{Oxa-23}R</i>	TCACAACAACCTAAAAGCA CTGT	50	641	
	<i>bla_{Oxa-51}F</i>	AACAAGCGCTATTTTTATT TCAG	50	825	
	<i>bla_{Oxa-51}R</i>	CCCATCCCCAACCCTTTT	49	453	
	<i>bla_{Oxa-40}F</i>	ATGAAAAAATTTATACTTC CTATATTCAGC			
	<i>bla_{Oxa-40}R</i>	TTAAATGATTCCAAGATTT TCTAGC			
	<i>bla_{Oxa-58}F</i> <i>bla_{Oxa-58}R</i>	AGTATTGGGGCTTGTGCT AACTCCCGTGCCTATTTG			
IS elemento	<i>ISAb1F</i>	CATTGGCATTAACTGAGG AGAAA	50	451	Sohrabi et al (2012)
	<i>ISAb1R</i>	TTGGAAATGGGGAAAACG AA			

2.4 Identificação de Patógenos Emergentes

2.4.1 Extração de DNA e Sequenciamento do Gene 16S rRNA

Isolados bacterianos foram cultivados em caldo cérebro coração (Merck, Alemanha) e incubados durante a noite a 37 ° C com agitação contínua a 120 rpm. A extração de DNA foi realizada usando um kit de extração (Invitrogen-PureLink® Genomic DNA Kits). PCR da região rDNA16S amplificou o DNA. A sequência dos primers 16SF e 16SR amplifica uma região de 400 pb (16SF-ACTGCTATCCACCCCTCAAAC e 16SR CTGGGTGAAGTTGTAATCGG). O produto de PCR foi purificado usando exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. A integridade do DNA genômico foi testada por eletroforese.

O sequenciamento do gene 16S foi realizado em sequenciador 3500 (Thermo Fisher Scientific). As reações de sequenciamento foram preparadas com 20 ng de DNA, 0,5 µl de Big Dye V3.1 (Thermo Fisher Scientific), 2,0 µl de tampão de sequenciamento 5X e 3,2 µmol de

primer. As sequências contínuas foram comparadas com sequências de referência e de grupo externo do National Center for Biotechnology Information usando o sistema BLAST para identificar semelhanças. A análise filogenética dos isolados foi realizada usando o método da máxima verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei (TAMURA AND NEI, 1993) usando um MEGA 11 (TAMURA et al., 2021). A confiança da ramificação foi testada usando 500 repetições de bootstrap.

2.4.2 Identificação por MALDI-TOF MS

Os isolados foram semeados em Brain Heart Infusion (Merck, Alemanha), incubados a 37 °C por 18 horas e enviados ao Instituto Hermes Pardini (Belo Horizonte, Brasil) para identificação microbiana por espectrometria de massas automatizada equipada com MALDI-TOF MS (BioMérieux, França). Resumidamente, uma colônia fresca foi espalhada em uma lâmina alvo Vitek MS DS e as preparações foram cobertas com 1 ml de solução matriz VITEK MS-CHCA (uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e ácido trifluoroacético em 2,5%). Após a secagem, a placa-alvo foi carregada no espectrômetro de massa Vitek MS e seca ao ar por 1 a 2 minutos em temperatura ambiente. A identificação microbiana foi obtida pela obtenção de espectros usando MALDI-TOF e analisando os espectros usando o banco de dados VITEK MS. Os picos espectrais foram comparados com o padrão característico de uma espécie, gênero ou família de microrganismos, resultando na identificação (DUBOIS et al., 2012; MOON et al., 2013; GONÇALVES et al., 2019). Uma probabilidade percentual (99,9%) representa a semelhança de picos específicos entre o espectro gerado e os espectros do banco de dados. Valores mais baixos foram designados como inconclusivos.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização Fenotípica, Teste de Suscetibilidade e Detecção de Genes de Resistência

Identificamos 677 colônias de superfícies de leitos de UTI; 56 isolados bacterianos foram obtidos para caracterização (8,2%; n = 677) (Tabela 2). Destes, 80,3% eram gram-positivos (n = 45) e 19,6% eram gram-negativos (n = 11) (Tabela 2). A análise de sensibilidade revelou uma taxa de resistência para cotrimoxazol de 44%, ceftazidima de 32%, ciprofloxacina de 28%, norfloxacina de 25% e cefepima de 23%. A menor taxa de resistência foi obtida para

minociclina e amicacina (1,7%) (Figura 1). Cinco isolados (ILH10, ILH14, ILH13, ILH16 e ILH2) foram resistentes a um antibiótico de várias classes (penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, polimixinas, tetraciclina e sulfonamidas) (Tabela 3). Outro isolado (ILH11) apresentou resistência apenas a antibióticos da classe dos β -lactâmicos (penicilina, cefalosporinas e carbapenêmicos). Não houve evidência da presença de genes de resistência relacionados a *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{OXA-58}* ou ao elemento ISAb1. Por outro lado, identificamos genes *bla_{OXA-23}* no isolado ILH10. Não houve evidência de *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{OXA-58}* ou ISAb1 nos isolados ILH11, ILH13, ILH14, ILH16 e ILH2; no entanto, esses isolados eram resistentes a pelo menos uma penicilina, cefalosporina ou quinolona (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Caracterização fenotípica de isolados de leitos de UTI hospitalar no Tocantins, Brasil.

Leitos UTI	No. de colônia bacteriana	No. isolados bacteriano	Características fenotípicas		
			Morfologia Celular	Gram positiva [%]	Gram negativa [%]
Leito 1	22	5	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos	80	20
Leito 2	34	5	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos	100	0
Leito 3	10	6	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos	83.3	16.7
Leito 4	89	4	Cocos; diplococos; diplobacilo; staphylococos	50	50
Leito 5	457	8	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos	62.5	37.5
Leito 6	5	4	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos	60	40
Leito 7	23	8	Bacilo; diplococos; staphylococos	75	25
Leito 8	36	11	Cocos; diplococos; bacilo; staphylococos; sarcinas	72	27.2
Leito 9	8	5	Cocos; Bacilo	40	60
Total	677	56		80.3	19.6

3.2 Identificação Bacteriana usando 16S rRNA e MALDI-TOF MS

Os isolados ILH10, ILH11, ILH13 e ILH2 foram identificados apenas no sequenciamento do gene 16S rRNA e pertenciam aos gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus* (Tabela 3). O isolado ILH10 foi submetido à análise filogenética envolvendo 19 sequências de nucleotídeos do gênero *Acinetobacter* (Figura 2). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão de pares). Houve 1593 posições no conjunto de dados final do isolado ILH10 que mostraram similaridade mais significativa com 99,3% para

Acinetobacter schindleri no BLAST, agrupando 90% no clado com bootstrap superior a 90% (Tabela 3; Figura 2).

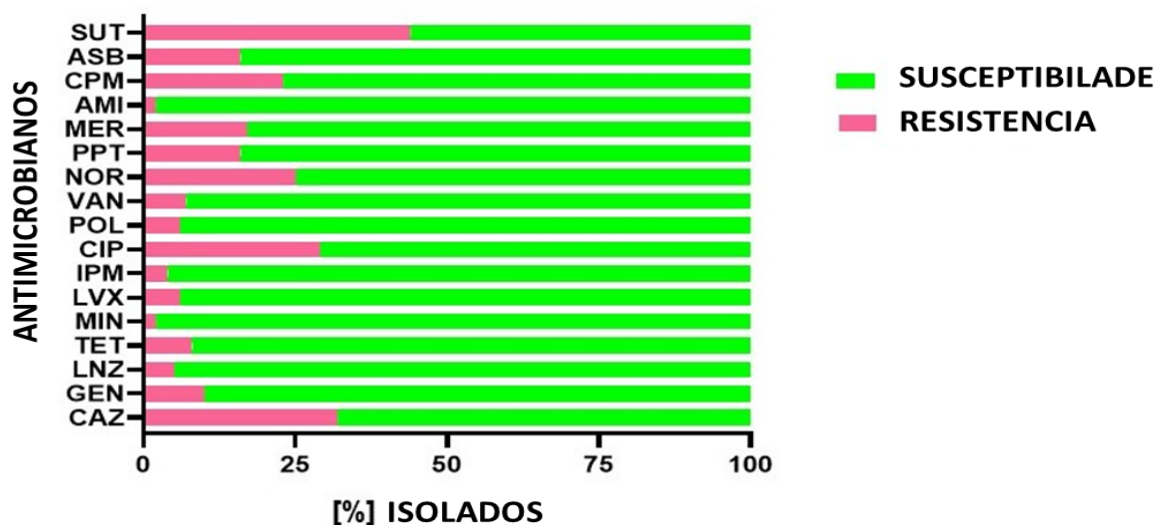


Figura 1. Taxas antimicrobianas de resistência bacteriana isoladas de leitos hospitalares de UTI (n = 56). Antibióticos: ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN), linezolida (LNZ), tetraciclina (TET), minociclina (MIN), levofloxacina (LVX), imipenem (IPM), ciprofloxacina (CIP), polimixina B (POL), vancomicina (VAN), norfloxacina (NOR), piperacilina/tazobactam (PPT), meropenem (MER), ampicilina (AMI), cefepima (CPM), ampicilina/sulbactam (ASB), cotrimoxazol (sulfatrin) (SUT), imipenem (IPM).

O isolado ILH13 foi submetido à análise filogenética envolvendo 18 sequências de nucleotídeos do gênero *Bacillus* (Figura 2). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão de pares). Houve 1555 posições no dataset final do isolado ILH13 que mostraram similaridade mais significativa com 100% para *Bacillus cereus* no BLAST, no clado com bootstrap superior a 90% (Tabela 3; Figura 2). O isolado ILH2 foi submetido à análise filogenética envolvendo 22 sequências de nucleotídeos do gênero *Bacillus* (Figura 2). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão de pares). Houve 1561 posições no dataset final do isolado ILH2 que apresentaram similaridade mais significativa com 99,7% para *Bacillus Licheniformis* no BLAST, no clado com bootstrap superior a 80% (Tabela 3; Figura 2). Apenas ILH14 e ILH 16 foram identificados usando MALDI-TOF MS, revelando *Sphingomonas paucimobilis* e *Bacillus circulans* (Tabela 4; Figura 3). ILH10, ILH11, ILH13 e ILH2 não foram detectados pela técnica porque o sistema não incluía um banco de dados de referência para identificação (Tabela 4).

Tabela 3. Resistência antimicrobiana de isolados e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Isolados Leitos UTI (Codigos)*	Nome Científico	Número Acesso GenBank	Cobertura (%)	Identidade (%)	N. Acesso GenBank 16S rRNA gene parcial sequencia	Resistencia Antimicrobial	Genes					MDR**
							<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>bla_{OXA-40}</i>	<i>bla_{OXA-58}</i>	<i>ISAba1</i>	
ILH10	<i>A. schindleri</i>	NR_025412.1	100	99.3	ON853562.1	caz, cpm, lvx, cip, asb, ppt, pol tet, sut,	P	N	N	N	N	P
ILH11	<i>B. subtilis</i>	NR_102783.2	98	97.4	ON853563.1	caz, cpm, asb, ppt, mer	N	N	N	N	N	N
ILH13	<i>B. cereus</i>	NR_115526.1	100	100	ON853564.1	caz, cpm, nor, lvx, cip asb, pol	N	N	N	N	N	P
ILH2	<i>B. licheniformis</i>	NR_118996.1	98	99.7	ON853570.1	cip, asb, ppt, gen, tet lnz,	N	N	N	N	N	P

Antibióticos: ceftazidima (caz), cefepima (cpm), norfloxacin (nor), levofloxacin (lvx), ciprofloxacina (cip), ampicilina/sulbactam (asb), piperacilina/tazobactam (ppt), meropenem (mer), gentamicina (gen) , polimixina B (pol), tetraciclina (tet), linezolida (lnz), cotrimoxazol (sulfatrin) (sut). P: Positivo; N: Negativo.

*ILH - Leitos Hospitalares Isolados..

** Bactérias multirresistentes.

Tabela 4. Resistência antimicrobiana de isolados e identificação microbiana por MALDI-TOF MS.

Isolados Leitos UTI (Codigos)*	Nome Científico (MALDI-TOF MS)	Resistencia Antimicrobial	Genes					MDR**
			<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-51}</i>	<i>bla_{OXA-40}</i>	<i>bla_{OXA-58}</i>	<i>ISAba1</i>	
ILH14	<i>S. paucimobilis</i>	cip, ppt, asb, gen, pol, tet lnz,	N	N	N	N	N	P
ILH16	<i>B. circulans</i>	caz cpm, nor, lvx, cip ppt, asb, Ipm	N	N	N	N	N	P

Antibióticos: ceftazidima (caz), cefepima (cpm), norfloxacin (nor), levofloxacin (lvx), ciprofloxacina (cip), ampicilina/sulbactam (asb), piperacilina/tazobactam (ppt), imipenem (ipm), gentamicina (gen) , polimixina B (pol), tetraciclina (tet), linezolida (lnz). P: Positivo; N: Negativo.

*ILH - Leitos Hospitalares Isolados.

** Bactérias multirresistentes

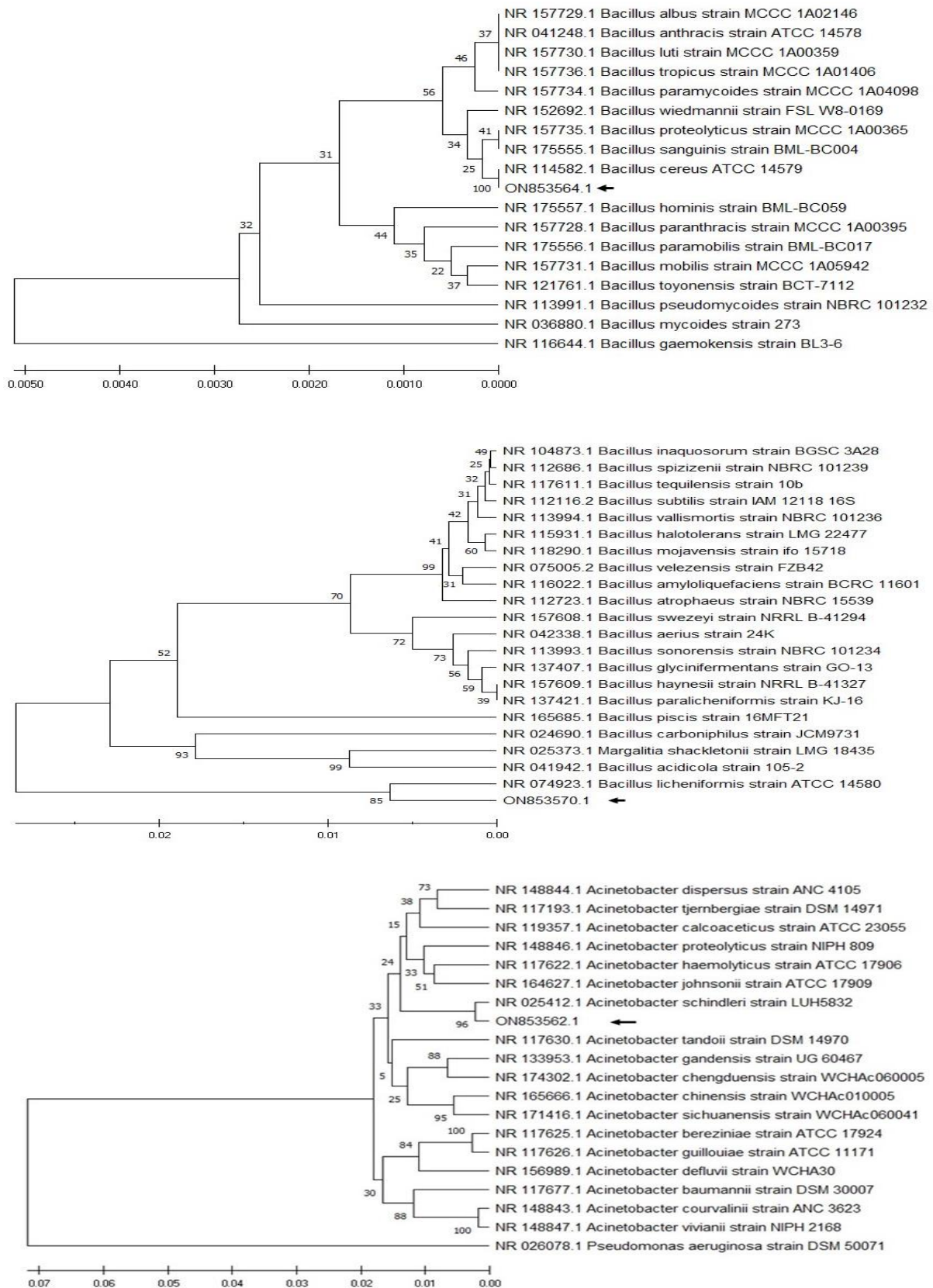


Figura 2. Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança das sequências do gene 16S rRNA (400 pb) do isolado ILH10 com identificação de depósito no GenBank ON853562.1 (seta preta). Isolado ILH13 com identificação de depósito no GenBank ON853564.1 (seta preta). Isolado ILH2 com identificação de depósito no GenBank ON853570.1 (seta preta). Os valores de bootstrap são indicados na raiz de cada ramificação.

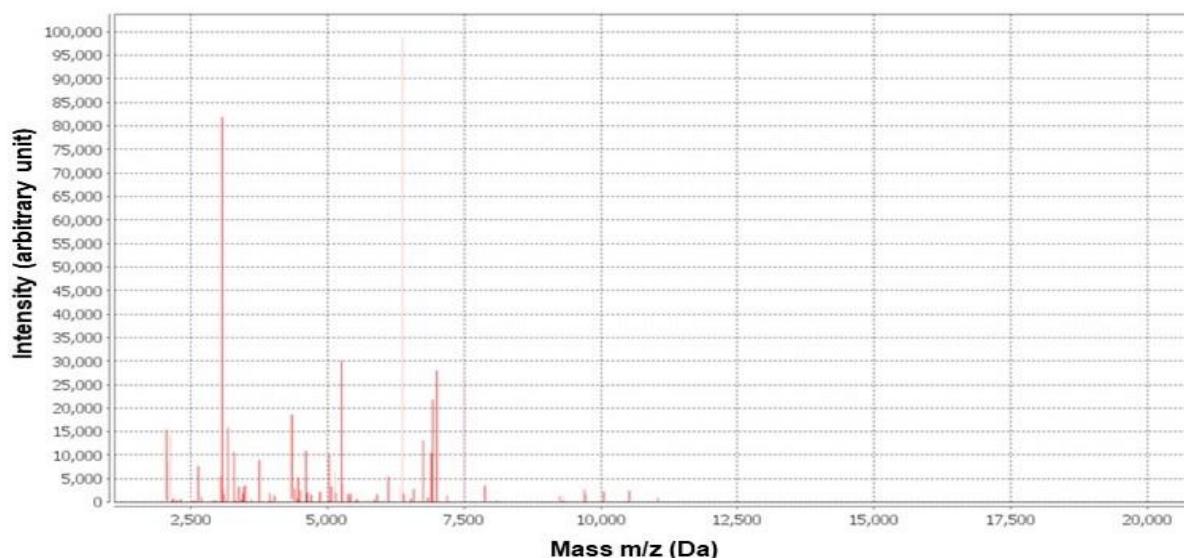


Figura 3. Espectrômetro de massa com o perfil proteômico do isolado ILH16 (*B. circulans*) por MALDI-TOF MS.

4. DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antibióticos inevitavelmente leva à resistência antimicrobiana, principalmente através da resistência natural e resíduos de antibióticos em esgotos e solos. (MORETTO et al., 2022). O Hospital Regional de Gurupi, local do estudo, é um centro de referência para 18 municípios do estado do Tocantins, o que pode favorecer a disseminação dos MDRs via disseminação entre comunidades e ambientes por meio de efluentes domésticos e alimentos (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002, CERCEO et al 2016). Esse fator explica a presença de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Sphingomonas* , encontradas no Hospital Regional de Gurupi, também comumente encontradas em água, solo e produtos alimentícios (LOGAN 2012; SMET et al. 2014; FERREIRA et al. 2019; ARBAB et al. 2021; CAVALHEIRA et al. 2021).

Infecções causadas por patógenos nosocomiais levam à morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados com o surgimento de bactérias multirresistentes (WEBER et al., 2010; OTTER et al., 2013; DANCER, 2014; SOOD AND PERL, 2016). Relatos mostraram que a formação de biofilme é favorável ao crescimento de colonização persistente com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina , *Acinetobacter spp.*, *Clostridium difficile* e *Pseudomonas aeruginosa* (KRAMER et al., 2006; BOYCE, 2007; CHEMALY et al., 2014; HU et al., 2015). Aqui, verificamos a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de

superfície de leito de UTI, mostrando a presença de bactérias MDR, descrição de genes de resistência e identificação por MALDI-TOF MS e sequenciamento 16S rRNA.

Limitações em relação ao banco de dados de perfis de proteínas de isolados tornam desafiador o uso de MALDI-TOF MS para identificar cepas bacterianas não convencionais de interesse médico. Estudos têm descrito a falha na identificação de cepas devido à ausência de um amplo espectro de proteínas de um banco de referência ou mesmo a técnica de captura de proteínas específicas necessárias para definir a espécie (BIZZINI et al., 2011; ALIZADEH et al., 2021). No entanto, os dados sobre sua aplicabilidade revelam a importância do MALDI-TOF MS na tipagem rápida de subespécies de importância médica; a técnica contribui para o manejo adequado dos antimicrobianos e boas práticas hospitalares. Por outro lado, suas limitações destacam a necessidade de aumentar os dados de referência para os bancos de referência (CROXATTO et al., 2011; ANGELETTI, 2017; DAVIES et al., 2021).

O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu maior abrangência e eficácia na identificação de microrganismos. A técnica é amplamente utilizada para a identificação da maioria dos táxons bacterianos. No entanto, a técnica envolve tempo de desempenho substancial e altos custos de processamento. (CLARRIDGE et al., 2004; BIZZINI et al., 2011; CHURCH et al., 2020; KOSECKA-STROJEK et al., 2020). Nosso trabalho utilizando a técnica 16S rRNA efetivamente identificou os isolados bacterianos classificados por similaridade e construção do perfil filogenético.

Para ILH-10 (*A. schindleri*), observamos fenótipos resistentes a vários antibióticos em diferentes classes. O isolado foi positivo para OXA-23, o que pode estar associado a um fenótipo de multirresistência aos beta-lactâmicos. *Acinetobacter* são patógenos oportunistas, e a maioria é clinicamente significativa, geralmente causando infecções nosocomiais graves em hospedeiros imunocomprometidos. (JOLY-GUILLOU, 2005; IBRAHIM et al., 2021). *Acinetobacter* é frequentemente associado ao acúmulo de diferentes mecanismos de resistência a antibióticos comercialmente disponíveis, incluindo carbapenêmicos. (FOURNIER et al., 2006; PÉRICHON et al., 2014; ZANDER et al., 2014). espécies produtoras de β -lactamases de classe D do tipo de gene oxa (por exemplo, *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. pittii*, *A. baylyi* e *A. schindleri*) foram relatadas em todo o mundo (BOO et al., 2009; ZHOU et al., 2011; ZANDER et al., 2014; SMET et al., 2014). Além disso, é essencial observar que genes de resistência em espécies não *A. baumannii* (*A. schindleri*) podem causar bacteremia devido à resistência a carbapenêmicos em pacientes imunocomprometidos (MONTAÑA, 2014).

S. paucimobilis (ILH14) é um patógeno oportunista envolvido em infecções nosocomiais; pode causar problemas significativos em ambientes clínicos quando resistente a antibióticos. Relatórios descreveram *S. paucimobilis* em amostras clínicas, sangue, urina,

aspirados endotraqueais, lavagem broncoalveolar e líquido cefalorraquidiano de pacientes com septicemia, meningite, infecções do trato respiratório inferior e pneumonia associada ao ventilador (ROHILLA et al., 2021). Foram relatados casos de endocardite infecciosa precoce de válvula protética causada por MDR *S. paucimobilis* (SABOE et al., 2021). O *S. paucimobilis* (ILH14) aqui isolado foi identificado usando a técnica MALDI-TOF MS com fenotipagem de antibióticos multirresistentes das classes quinolona, penicilina, aminoglicosídeo, polimixina, tetraciclina e oxazolidinona..

Bacillus sp. isolados (ILH11, ILH13, ILH2 e ILH16) mostraram resistência a antibióticos clinicamente relevantes, como cefalosporinas, quinolonas e penicilinas. Este gênero é amplamente distribuído no meio ambiente, incluindo solo, poeira, ar, fômites, água e ambientes hospitalares (BOTTONE 2010). A ampla diversidade de *Bacillus* permite a regulação gênica que aumenta sua patogenicidade (BOTTONE 2010). Estudos anteriores identificaram fenótipos MDR neste grupo (TORKAR AND BEDENIC, 2018; LIU et al., 2018, MILLS et al., 2022). Algumas cepas multirresistentes de *Bacillus* sp obtidas no presente estudo causam intoxicação alimentar. Também podem causar feridas localizadas e infecções oculares; em ambiente hospitalar, podem causar bacteremia nosocomial (KUROKI et al., 2009, EHLING-SCHULZ et al., 2021) e meningite em pacientes imunocomprometidos (GAUR et al., 2001). Infecções oportunistas por *Bacillus circulans* foram identificadas em pacientes imunocomprometidos (RUSSO et al., 2021).

Em resumo, nossos achados sugerem que várias cepas obtidas de UTIs apresentaram resistência a várias classes de antimicrobianos identificados por técnicas moleculares e MALDI-TOF MS; no entanto, a última técnica pode ser mais relevante quando associada à fenotipagem de resistência antimicrobiana para auxiliar o manejo antimicrobiano. Nossos achados reforçam a necessidade de investigar genes de resistência da classe das β -lactamases. Finalmente, nossos achados sugerem a necessidade de amplificação na detecção de genes específicos de resistência. Nossas descobertas também contribuem para identificar fontes de contaminação responsáveis pelo aumento dos níveis de organismos multirresistentes. O monitoramento dessas fontes melhorará os controles de infecção ambiental, alimentar e de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ADWAN, G.; OMAR, G. Phenotypic and molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Palestine. **Brazilian Journal of Biology**, v.82, e239868, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.239868>.
- ALIZADEH, M.; YOUSEFI, L.; PAKDEL, F.; GHOTASLOU, R.; REZAEI, M. A.; KHODADADI, E.; KAFIL, H. S. MALDI-TOF mass spectroscopy applications in clinical microbiology. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2021, p. 1-8, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9928238>.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>.
- ARBAB, S.; ULLAH, H.; WEI, X.; WANG, W.; AHMAD, S.U.; ZHANG, J. Drug resistance and susceptibility testing of Gram negative bacterial isolates from healthy cattle with different β -Lactam resistance Phenotypes from Shandong province China. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, Article ID e247061, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.247061>.
- BARTLEY, P.S.; DOMITROVI, T.N.; MORETTO, V.T.; SANTOS, C.S.; PONCE-TERASHIMA, R.; REIS, M.G.; BARBOSA, L.M.; BLANTON, R.E.; BONOMO, R.A.; PEREZ F. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, 2019. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0726>.
- BERNARDS, A.T.; HARINCK, H.I.J.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T.J.K.; VAN DEN BROEK, P.J. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 11, p. 1002-1004, 2004. <https://doi.org/10.1086/502335>.
- BIZZINI, A.; JATON, K.; ROMO, D.; BILLE, J.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 693-696, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>.
- BONELLI, R.R.; MOREIRA, B.M.; PICÃO, R.C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates**, v. 17, n. 2, p. 24-36, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>.
- BOO, T.W.; WALSH, F.; CROWLEY, B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 2, p. 209-216, 2009. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.004911-0>.

BOTTONE, E. J., *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-98, 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>.

BOYCE, J.M. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. **J Hosp Infect.** v. 65, n. 2, p. 50–4, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60015-2).

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.

CARVALHEIRA, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. *Acinetobacter spp.* in food and drinking water—a review. **Food Microbiology**, v. 95, Article ID 103675. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103675>.

CASTILHO, S.R.A.; GODOY, C.S.D.M.; GUILARDE, A.O.; CARDOSO, J.L.; ANDRÉ M.C.P.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A. 2017. Strains isolated from patients in intensive care units in Goiania, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS One**, v. 12, n. 5, Article ID e0176790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>.

CERCEO, E.; DEITELZWEIG, S. B.; SHERMAN, B. M.; AMIN, A. N. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 412-431, 2016. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0220>.

CHEMALY, R.F.; SIMMONS, S.; DALE, C.; GHANTOJI, S.S.; RODRIGUEZ, M.; GUBB, J.; STACHOWIAK, J.; STIBICH, M. The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. **Ther Adv Infect Dis.**, v. 2, n. 3–4, p. 79–90, 2014. <https://doi.org/10.1177/2049936114543287>.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>.

CHURCH, D.L.; CERUTTI, L.; GÜRTLER, A.; GRIENER, T.; ZELAZNY, A.; EMLER, S. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, article ID e00053-19, 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Supplement M100, 27th Edn. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.

DANCER, S.J. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 665–90, 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14>.

DAVIES, Y.M.; FRANCO, L.S.; BARBOSA, F.B.; VANIN, C.L.; GOMES, V.T.D.M.; MORENO, L.Z.; BARBOSA, M.R.F.; SATO, M.I.Z.; MORENO, A.M.; KNÖBL, T. Use of MALDI-TOF for identification and surveillance of gram-negative bacteria in captive wild psittacines. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.233523>.

DUBOIS, D.; GRARE, M.; PRERE, M.F.; SEGONDS, C.; MARTY, N.; OSWALD, E. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, JCM-00343, p.12, 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.00343-12>.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 3, p. 7-3, 2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>.

FERREIRA, R.L.; DA SILVA, B.C.; REZENDE, G.S.; NAKAMURA-SILVA, R.; PITONDO-SILVA, A.; CAMPANINI, E.B.; PRANCHEVICIUS, M.C.D.S. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3198, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03198>.

FOURNIER, P.E.; RICHET, H.; WEINSTEIN, R.A. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 5, p. 692-699, 2006. <https://doi.org/10.1086/500202>.

GADDY, J.A.; TOMARAS, A.P.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infection and immunity**, v. 77, n. 8, p. 3150-3160, 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09>.

GALLINI, A.; DEGRIS, E.; DESPLAS, M.; BOURREL, R.; ARCHAMBAUD, M.; MONTASTRUC, J.L.; LAPEYRE-MESTRE, M; SOMMET, A. Influence of fluoroquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a university hospital. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2650-2657, 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq351>.

GAUR, A.H.; PATRICK, C.C.; MCCULLERS, J.A.; FLYNN, P.M.; PEARSON, T.A.; RAZZOUK, B.I.; SHENEP, J.L. *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 10, Article ID 1456-1462, 2001. <https://doi.org/10.1086/320154>.

GONÇALVES, G.G.A.; FEITOSA, A.P.S.; PORTELA-JUNIOR, N.C.; DE OLIVEIRA, C.M.F.; DE LIMA FILHO, J.L.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C. Use of MALDI-TOF MS to identify the culturable midgut microbiota of laboratory and wild mosquitoes. **Acta tropica**, v. 200, Article ID 105174, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105174>.

HU, H.; JOHANI, K.; GOSBELL, I.B.; JACOMBS, A.S.; ALMATROUDI, A.; WHITELEY, G.S.; DEVAA, A.K.; JENSEN, S.; VICKERY, K. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. **J Hosp Infect**. v. 91, n. 1, p. 35–44, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.05.016>.

IBRAHIM, S.; AL-SARYI, N.; AL-KADMY, I.; AZIZ, S.N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>.

JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical microbiology and infection**, v. 11, n. 11, p. 868-873, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x>.

KOLLEF, M.H.; TORRES, A.; SHORR, A.; MARTIN-LOECHES, I.; MICEK, S.T. Nosocomial infection. **Critical care medicine**, v. 49, n. 2, p. 169-187, 2021. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004783>.

KOSECKA-STROJEK, M.; SABAT, A.J.; AKKERBOOM, V.; KOOISTRA-SMID, A.; MIEDZOBRODZKI, J.; FRIEDRICH, A.W. Development of a reference data set for assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* species based on next generation sequencing of the 16S–23S rRNA region. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0622-3>.

KRAMER, A.; SCHEWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis**. v. 6, p. 130, 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>.

KUROKI, R.; KAWAKAMI, K.; QIN, L.; KAJI, C.; WATANABE, K.; KIMURA, Y.; WATANABE, H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Internal medicine**, v. 48, n. 10, p. 791-796, 2009. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.48.1885>.

LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S.; KIM, Y.B.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 895, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>.

LIU, T.; ZHU, L.; ZHANG, Z.; JIANG, L.; HUANG, H. Draft genome sequence of *Bacillus* sp. M13 (2017) a multidrug-resistant subclass B1 blaNDM-producing, spore-forming bacterium isolated from China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 152-153, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.07.002>.

LOGAN, L.K. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: an emerging problem in children. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 6, p. 852-859, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cis543>.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; 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, p. 268-281, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; SILVA, M.C.G.; GONÇALVES, V.D.; BRUM, P.R.; CASTRO, A.R.; PEREIRA, A.A.; ESTEVES, F.A.; PEREIRA, J.A.A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400002>.

MILLS, E.; SULLIVAN, E.; KOVAC, J. Comparative Analysis of *Bacillus cereus* Group Isolates' Resistance Using Disk Diffusion and Broth Microdilution and the Correlation between Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes. **Applied and environmental microbiology**, v. 88 n.6, Article ID e02302-21, 2022. <https://doi.org/10.1128/aem.02302-21>.

MONTAÑA, S.; PALOMBARANI, S.; CARULLA, M.; KUNST, A.; RODRIGUEZ, C.H.; NASTRO, M.; VAY, C.; RAMIREZ, M.S.; ALMUZARA, M. First case of bacteraemia due to *Acinetobacter schindleri* harbouring blaNDM-1 in an immunocompromised patient. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 28-30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.004>.

MOON, H.W.; LEE, S.H.; CHUNG, H.S.; LEE, M.; LEE, K. Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1301-1306, 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062950-0>.

MORETTO, V. T.; BARTLEY, P. S.; FERREIRA, V. D. M.; SANTOS, C. S.; SILVA, L. K.; PONCE-TERASHIMA, R. A.; BARBOSA, L. M. Microbial source tracking and antimicrobial resistance in one river system of a rural community in Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.231838>.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61-74, 2016. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0009>.

OTTER, J.A.; YEZLI, S.; SALKELD, J.A.; FRENCH, G.L. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. **Am. J. Infect. Control.**, v. 41, n. 5, p. S6–11, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.004>.

PÉRICHON, B., GOUSSARD, S., WALEWSKI, V., KRIZOVA, L., CERQUEIRA, G., MURPHY, C., COURVALIN, P. Identification of 50 class D β -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 936-949, 2014. <https://doi.org/10.1128/AAC.01261-13>.

ROHILLA, R.; RAINA, D.; SINGH, M.; PANDITA, A. K.; PATWAL, S. Evaluation of *Sphingomonas paucimobilis* as an emerging nosocomial pathogen in a teaching hospital in Uttarakhand. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 617, 2021. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i5.7425>.

RUSSO, A.; TARANTINO, U., D'ETTORRE, G., DELLA ROCCA, C., CECCARELLI, G., GASBARRA, E., IUNDUSI, R. First report of spondylodiscitis caused by *Bacillus circulans* in an immunocompetent patient: Clinical case and review of the literature. **IDCases**, v. 23, Article ID e01058, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01058>.

SABOE, A.; ADRIAN, Y.; WIDYATMOKO, L.; HASAN, M.; COOL, C. J.; HARTANTRI, Y.; RAHMADIC, R. A.; NUSJIRWAN, R.; AKBAR, M. R. A fatal case of early prosthetic valve endocarditis caused by multidrug-resistant (MDR)–*Sphingomonas paucimobilis*. **IDCases**, v. 24, Article ID e01152, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01152>.

SMET, A., COOLS, P., KRIZOVA, L., MAIXNEROVA M., SEDO, O., HAESBROUCK, F., KEMPF, M., NEMEC, A., VANECHOUTTE, M. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4007-4015, 2014. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.068791-0>.

SOHRABI, N.; FARAJNIA, S.; AKHI, M. T.; NAHAEI, M. R.; NAGHILI, B.; PEYMANI, A.; SAEEDI, N. Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. **Microbial drug resistance**, v. 18, n. 4, p. 385-389, 2012. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0077>.

SOOD, G.; PERL, T. Outbreaks in health care settings. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 3, p. 661-687, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.04.003>.

STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D.; HAUSCHILD, T.; RÓŻAŃSKI, P.; MAREK, A. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus spp.* from wild birds and differentiation of closely related species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p.1128-1137, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1612.12036>.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** v. 10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S.; MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. 2021, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TORKAR, K.G.; BEDENIĆ, B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 140-145, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.026>.

TSUCHIDA, S., UMEMURA, H., NAKAYAMA, T. 2020.Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. **Molecules**, 25(20), 4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; MILLER, M.B.; HUSLAGE, K.; SICKBERT-BENNETT, E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter species*. **Am. J. of infect. Control.**, v. 38, n. 5, p. S25-S33. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.04.196>.

ZANDER, E.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; SCHLEICHER, X.; DAMMHAYN, C.; KAMOLVIT, W.; SEIFERT, H.; HIGGINS, P.G. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases in *Acinetobacter spp.* other than *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 4, p. 375-377, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012>.

ZHOU, Z.; DU, X.; WANG, L.; YANG, Q.; FU, Y.; YU, Y. Clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baylyi* strain coharboring bla SIM-1 and bla OXA-23 from China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5347-5349, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.00425-11>.

Artigo - vaccines - Journals | MDPI | Qualis: A3 | Fator de impacto: 4.9
<https://doi.org/10.3390/vaccines11030669>

Using an aluminum hydroxide–chitosan matrix increased the vaccine potential and immune response of mice against multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a gram-negative, immobile, aerobic nosocomial opportunistic coccobacillus that causes pneumonia, septicemia, and urinary tract infections in immunosuppressed patients. There are no commercially available alternative antimicrobials, and multidrug resistance is an urgent concern requiring emergency measures and new therapeutic strategies. In this study, we evaluated a multidrug-resistant *A. baumannii* whole-cell vaccine, inactivated and adsorbed on an aluminium hydroxide-chitosan (mAhC) matrix, in an *A. baumannii* sepsis model in immunosuppressed mice by cyclophosphamide (CY). CY-treated mice were divided into immunized, non-immunized, and adjuvant-inoculated groups. Three vaccine doses were given at 0D, 14D, and 28D, followed by a lethal dose of 4.0×10^8 CFU/ml of *A. baumannii*. Immunized CY-treated mice induced a significant humoral response, with the highest IgG levels and a higher survival rate (85%) differing from non-immunized CY-treated mice, with no survivors ($p < 0.001$), or from the adjuvant group, with 45% survival ($p < 0.05$). Histological data revealed evident expansion of white spleen pulp from immunized CY-treated mice, whereas, in non-immunized and adjuvanted CY-treated mice, there was more significant organ tissue damage. Our results confirmed a proof-of-concept of the immune response and vaccine protection in a sepsis model in CY-treated mice, contributing to the advancement of new alternatives for protection against *A. baumannii* infections.

Keywords: multi-drug-resistant; *Acinetobacter baumannii*; Immunosuppression model; Inactivated whole-cell vaccine.

O uso de uma matriz de hidróxido de alumínio-quitosana aumentou o potencial da vacina e a resposta imune de camundongos contra o *Acinetobacter baumannii* multiresistente a drogas.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo oportunista nosocomial, gram-negativo, imóvel, aeróbico, que causa pneumonia, septicemia e infecções do trato urinário em pacientes imunossuprimidos. Não há antimicrobianos alternativos comercialmente disponíveis, e a resistência a múltiplas drogas é uma preocupação urgente que requer medidas de emergência e novas estratégias terapêuticas. Este estudo avaliou uma vacina de célula inteira de *A. baumannii* multirresistente, inativada e adsorvida em uma matriz de hidróxido de alumínio-quitosana (mAhC), em um *A. baumannii*, inativada e adsorvida em uma matriz de hidróxido de alumínio-quitosana (mAhC), em um modelo de sepse em camundongos imunossuprimidos por ciclofosfamida (CY). Camundongos tratados com CY foram divididos em grupos imunizados, não imunizados e inoculados com adjuvante. Três doses de vacina foram dadas em 0D, 14D e 28D, seguidas por uma dose letal de $4,0 \times 10^8$ UFC/mL de *A. baumannii*. Camundongos imunizados tratados com CY apresentaram uma resposta humoral significativa, com os níveis mais altos de IgG e uma taxa de sobrevivência mais alta (85%); isso diferiu dos camundongos não imunizados tratados com CY, nenhum dos quais sobreviveu ($p < 0,001$), e do grupo adjuvante, com 45% de sobrevivência ($p < 0,05$). Os dados histológicos revelaram a evidente expansão da polpa branca do baço de camundongos imunizados tratados com CY, enquanto que, em camundongos não imunizados e tratados com CY adjuvante, houve dano tecidual de órgão mais significativo. Nossos resultados confirmaram a prova de conceito da resposta imune e proteção vacinal em um modelo de sepse em camundongos tratados com CY, contribuindo para o avanço de novas alternativas de proteção contra infecções por *A. baumannii*.

Palavras-chave: multirresistente a drogas; *Acinetobacter baumannii*; modelo de imunossupressão; vacina de células inteiras inativadas.

1. INTRODUÇÃO

O *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo oportunista gram-negativo, imóvel, aeróbico, que causa pneumonia, septicemia, infecções do trato urinário e meningite, principalmente em pacientes imunocomprometidos, internados por longos períodos ou submetidos a procedimentos invasivos com uso prévio de antimicrobianos (GIAMARELLOU et al., 2008; LESHIO et al., 2013; WONG et al., 2017; CASTILHO et al., 2017; MUNIER et al., 2019). *A. baumannii* é um organismo emergente que existe como Multidrogas resistentes (isto é, resistente a três ou mais classes de antimicrobianos), Extensivamente drogas resistente (isto é, resistente a todas as classes de antimicrobianos, exceto uma ou duas) ou Pan drogas resistente (ou seja, resistente a todas as classes antimicrobianas existentes) (MAGIORAKOS et al., 2012; ZARRILLI et al., 2013). A resistência a múltiplas drogas é um processo multifatorial; ocorre através da produção da enzima cromossômica AmpC β -lactamase e da oxacilinase intrínseca, perda da expressão de porinas, superexpressão de sistemas de expulsão ativos, alterações na permeabilidade da membrana externa, efluxo antimicrobiano e alterações nos locais de ligação de drogas (MANCUSO et al., 2021; KYRIAKIDIS et al., 2021). Resiste aos carbapenêmicos adquirindo genes que codificam β -lactamase, pertencentes ao grupo 23 bla OXA-gene, que inclui OXA-27, OXA-49 e OXA-73; esta alteração dá origem à permeabilidade do fármaco e aos mecanismos que modulam a afinidade antibiótica (ZARRILLI et al., 2013; LIN et al., 2016; YANG AND RUI 2016; LEE et al., 2017).

Modelos murinos de sepse e pneumonia causada por *A. baumannii* contribuam para o entendimento da patogênese e da dinâmica da resposta do hospedeiro, pois esses animais desenvolvem infecções agudas com alterações patológicas; eles podem, portanto, ser usados para a elaboração de novos protocolos de infecção e controle de qualidade de vacinas e para o desenvolvimento de intervenções farmacológicas (BRASIL, 2002; SOBRINHO et al., 2010; McCONNELL et al., 2013; BRANDI et al., 2014; CANGUSSU et al., 2018; SANTOS et al., 2019; FELIX et al., 2019; BRITO et al., 2021).

A maioria dos modelos de infecção usa ciclofosfamida (CY) ou aumento da virulência de *A. baumannii* (por mucina) que causa infecções semelhantes às encontradas em pacientes (CHEN et al., 2020). A CY é a droga imunossupressora mais amplamente utilizada em modelos murinos para entender os mecanismos da doença e as respostas imunes (CABRAL et al., 2017; CHEN et al., 2020; DOLLERY et al., 2021). É um agente alquilante imunossupressor que causa redução de neutrófilos polimorfonucleares e predispõe o hospedeiro a infecções graves (TSAI et al., 2021), inativando o ciclo rápido da população de células imunes, causando granulopenia

(DIEHL et al., 2017; LIU et al., 2020; DOLLERY 2021), e diminuição dos linfócitos B e linfócitos T no baço e linfonodos (IKEZAWA et al., 2005; LIU et al., 2020).

Estratégias de vacinação baseadas em cepas bacterianas multirresistentes inativadas empregam principalmente adsorção de antígeno, predominantemente em hidróxido de alumínio ou adjuvante completo de Freund (McCONNELL et al., 2010; JIN et al., 2011; LUO et al., 2012; GARCÍA-QUINTANILLA et al., 2014; SHU et al., 2016; CABRAL et al., 2017; RAMEZANALIZADEH et al., 2020). Por outro lado, novas moléculas como a quitosana têm sido utilizadas como adjuvantes vacinais. A quitosana é um polímero natural, não tóxico, biodegradável e biocompatível usado na engenharia de tecidos e controle de liberação de drogas que estimula respostas imunes celulares e é mais eficiente e seguro do que o adjuvante incompleto de Freund ou hidróxido de alumínio (SARI et al., 2016; DOLLERY et al., 2021).

Diante desse cenário, propomos um estudo de prova de conceito usando modelos murinos. Nós avaliamos as respostas imunes usando camundongos tratados com CY imunizados com uma vacina contendo células inteiras inativadas de *A. baumannii* resistente a múltiplas drogas adsorvidas em hidróxido de alumínio-quitosana (mAhC). Pretendemos contribuir para a busca de alternativas de proteção contra infecções por *A. baumannii*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cepa *A. baumannii* e Determinação da Dose Letal

O *A. baumannii* cepa foi cedida pelo Laboratório Central do Tocantins (Lacen/TO) e armazenada a -80 °C no Laboratório de Biomoléculas e Vacinas da Universidade Federal do Tocantins (LaBVac/UFT). Esta cepa foi isolada em ambiente hospitalar e caracterizada como multidroga resistentes a classe dos carbapenêmicos para os genes oxacilinasas bla_{OXA-23} e bla_{OXA-51}, realizada por meio de reação em cadeia da polimerase multiplex in house (Fiocruz/RJ). A cepa foi cultivada em 10 mL de caldo tríptico de soja (TSB) (soja peptona 17 g/L; caseína 3 g/L; dextrose 5 g/L; fosfato de potássio monobásico 5 g/L) sob agitação a 120 rpm a 37 °C por 8h. Ao final do cultivo, todo o volume foi transferido para 90 mL de caldo tríptico de soja (TSB) esterilizado e incubado sob agitação a 120 rpm e 37 °C por 14 h. Subseqüentemente, 30 mL de cultura foram centrifugados e lavados em solução salina para padronizar as diluições seriadas do fator 4 (1/4–1/1024). Três camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 500 µL de cada uma das diluições descritas acima para determinar a dose letal e correlação com a concentração celular (CFU/mL) (GARCÍA-QUINTANILLA et al., 2014).

2.2 Inativação da Cultura de *A. baumannii*

As culturas de *A. baumannii* foram incubadas durante a noite em caldo de cérebro e coração (Merck, Darmstadt, Alemanha) sob agitação a 120 rpm a 37 °C. As densidades celulares estavam na densidade óptica: 600 nm (OD 600) = 0,8. Posteriormente, foram inativados com formaldeído a 3% (Alphatec ® , São Paulo, Brasil) por 2 h a 30 °C, seguidas de 16 h a 60 °C, sob agitação de 120 rpm. A inativação foi confirmada pela adição de 1 mL da cultura inativada ao ágar Mueller-Hinton (Kasvi ® , Paraná, Brasil) e incubação a 37 °C por 48 h (SHU et al., 2016).

2.3 mAhC e Formulação Vacinal

O mAhC foi preparado com solubilização prévia da quitosana utilizando pó de quitosana (Polymar, 81% grau de desacetilação) em ácido acético 0,8% (v / v), solução salina 0,9% (p / v), com uma proporção de quitosana e hidróxido de alumínio de 2 :1, respectivamente. Grupos de quatro animais foram empregados para avaliar o número de doses de mAhC. Camundongos Swiss fêmeas foram inoculados por via intramuscular com 100 µL do mAhC (sem antígeno *A. baumannii*) em uma única dose, no tempo zero (0 D), com doses duplas às vezes (0 D, 14 D) e doses triplas aos 0 D , 14 D e 28 D. Após a última inoculação, os animais foram desafiados com uma dose letal de *A. baumannii* administrado por via intraperitoneal (500 µL), e foram então monitorados quanto às manifestações clínicas; em seguida, foi determinada a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. A formulação da vacina consistiu em uma concentração celular de *A. baumannii* de 1×10^9 células.mL⁻¹ a 1:1 (v / v) com matriz de quitosana (1,25%, p / p) associada a hidróxido de alumínio (1,6 mg) (Dinâmica ® , Belo Horizonte, Brasil) (JIN et al., 2021).

2.4 mAhC e Cálculos Acoplamento Molecular

O ligante selecionado para o estudo de acoplamento molecular foi a quitosana, e suas estruturas 3D foram construídas na forma neutra usando Marvin Sketch 18.10, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>, acessado em 31 de janeiro de 2023). As sequências de aminoácidos de lipopolissacarídeos (LPS) de *Acinetobacter baumannii* foram obtidas do banco de dados do servidor UniProt (<http://uniprot.org> , acessado em 31 de janeiro de 2023). As estruturas 3D de ambas as proteínas foram construídas usando a abordagem de modelagem de homologia com

The Swiss Model Workspace (<https://swissmodel.expasy.org/> , acessado em 31 de janeiro de 2023) após selecionar seus respectivos modelos usando a ferramenta BLASTp. Os modelos foram baixados do The Protein Databank (<https://www.rcsb.org/>, acessado em 31 de janeiro de 2023), considerando parâmetros de qualidade, como método experimental, resolução e valor R, e sua complexação com um ligante. Usamos o modelo Swiss para verificar quebras de estrutura de proteínas e posicionamento de aminoácidos no sítio ativo (WATERHOUSE et al., 2018). Os modelos gerados foram validados pela inspeção dos gráficos de Ramachandran (RAMACHANDRAN AND SASISEKHARAN, 1968; HAAS et al., 2018), nos quais foi possível analisar a distribuição dos ângulos de torção esquelética ϕ e ψ responsáveis pela qualidade estereoquímica da proteína estudada, bem como o fator QMEAN (BENKERT et al., 2011). Alvos e ligantes foram preparados para o processo de acoplamento molecular utilizando Autodock Tools 1.5.7 (SANNER, 1999), de acordo com a metodologia proposta por Moura et al. (2020). Utilizando o AutoDock Vina (TROTT AND OLSON, 2010), nos cálculos de acoplamento, nove posições de acoplamento foram geradas para ligantes interagindo com os alvos, retornando valores de energia de afinidade (kcal/mol). Os resultados da posição de encaixe foram analisados usando PyMOL 2.0 (SCHRODINGER, 2018) e Discovery Studio 4.5 (BIOVIA, 2017) para selecionar a melhor posição para cada ligante dentro da proteína alvo usando os parâmetros propostos por Moura et al. (2020).

2.5 Requerimentos éticos/legais e uso de animais em experimentos

Este estudo utilizou camundongos Swiss fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, pesando 17–23 g. Eles foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e colocados na sala de testes pré-clínicos do Laboratório de Biomoléculas e Vacinas (LaBVac). Os camundongos foram alojados em um compartimento primário livre de patógenos com livre acesso a comida e água; o recinto foi mantido a 24 °C, com controle de odor e luminosidade com ciclo de claro e escuro a cada 12 h. Todos os animais deste experimento foram previamente vermifugados com acesso a solução de Ivermectina® 1:20 solução por sete dias. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas estabelecidas pela lei de procedimentos para o uso científico de animais, sendo aprovados para execução pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da UFT sob o protocolo número 23101.002359/2020-31. Todo esforço foi feito para evitar sofrimento ou dor indevida; os camundongos foram monitorados quanto à perda e ganho de peso e manifestações clínicas como letargia, hipotermia e dificuldade respiratória. Os animais foram sacrificados com cetamina (300 mg/kg) (Vetbrands®, Rio de

Janeiro, Brasil) e cloridrato de xilazina (22,5 mg/kg) (Syntec®, Piracicaba, Brasil) (CANGUSSU et al., 2018; SANTOS et al., 2019; FELIX et al., 2019).

2.6 Desenho experimental

Camundongos receberam 3 doses intraperitoneais de CY (Genuxal ® Baxter, São Paulo, Brasil) (150 mg/Kg) por 7 dias em intervalos de 36 horas (JIN et al., 2011). Amostras de sangue foram coletadas para análises hematológicas no Centro de Clínica Veterinária Pet Shop Dog (Gurupi/TO-Brasil). Uma vez estabelecido o quadro de imunossupressão, 10 camundongos Swiss imunossuprimidos foram usados para administrar 100 µL da composição da vacina em 3 doses em 0D, 14D e 28D. Outros grupos de 10 camundongos imunossuprimidos foram inoculados com 100 µL de solução adjuvante (grupo mAHC) e solução salina tamponada com fosfato (PBS) (grupo não imunizado) nos tempos correspondentes de 0D, 14D, 28D. Então, 7 dias após a imunização final (35D), os camundongos foram desafiados com 500 µL de uma dose letal previamente definida e administrada por via intraperitoneal de *A. baumannii* (GARCÍA-QUINTANILLA et al., 2014). Os animais foram monitorados quanto aos aspectos clínicos, e amostras biológicas foram coletadas.

2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) usando Cultura de *A. baumannii*.

Amostras de sangue de camundongos imunossuprimidos após a última imunização (28D) e após o teste de desafio (35D) foram avaliadas para estimular a produção total de IgG. O ELISA foi utilizado com cultura de *A. baumannii*, que utilizou 10 mL de TSB para *A. baumannii*, sob agitação a 120 rpm a 37 °C, por 8 h (pré-inóculo). Posteriormente, a suspensão bacteriana foi lavada em solução salina, centrifugada para retirar todo o caldo de cultura e utilizada para padronização e fixação do antígeno (RAMEZANALIZADEH et al., 2020). Concentração celular de 10⁶CFU/mL foi usado para sensibilidade noturna de microplacas de 96 poços (Nunc MaxiSorp durante) a 4 °C. Após bloqueio por 1 h com tampão caseína-PBS a 2% (tampão de bloqueio) à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão Tween-20-PBS a 0,05%. O soro foi diluído a 1:50 com tampão de bloqueio e incubado por 16 h a 4 °C. Após a lavagem, conjugado anti-rato IgG peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi usado na proporção de 1:2000 no tampão de bloqueio. Após a lavagem, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foi adicionado por 15 min e bloqueado com 2,5 M H₂SO₄ (Dinâmica®, Belo Horizonte, Brasil). A densidade óptica foi medida em 450 nm, e valores acima do ponto de corte foram considerados positivos. A

densidade óptica média do soro determinou o ponto de corte antes da imunização (CANGUSSU et al., 2018).

2.8 Análise Histopatológica

Após o término do teste de análise de dose letal, foi realizada a análise histopatológica dos órgãos por meio da coleta de fígado, pulmão e baço de três animais não imunizados, tratados com mAhC e imunizados. Os órgãos foram pesados e fixados em solução tamponada com formol a 10%. Posteriormente, foram desidratados em álcool (Qhemis[®], São Paulo, Brasil), diafanizados em xilol (Synth[®], Porto Alegre, Brasil) e incluídos em parafina histológica (Synth[®], Porto Alegre, Brasil). Em seguida, cortes de 5 microns foram feitos com micrótomo, corados em hematoxilina/eosina e examinados em microscópio óptico Leica DM1000 LED (Software Application Suite versão 4.9.0) com objetivas de 10, 40 e 100×.

Lâminas histológicas do fígado, pulmão e baço foram analisadas quanto ao dano tecidual causado pela infecção por *A. baumannii*, avaliando a presença de edema, degeneração, necrose, inflamação aguda e hiperemia. O dano histopatológico foi classificado pelo escore da lesão considerando o grau de alteração (se ausente) quando não havia evidência de dano, discreto se evidente em até 25% do campo de observação, moderado se maior que 25%, mas menor que 50%, ou grave se maior que 50% (CANGUSSU et al., 2018).

Conforme descrito anteriormente, análises de expansão de polpa branca de baços de camundongos imunossuprimidos foram realizadas (PAPADOPULOS et al., 2007). As seções histológicas do baço foram analisadas por captura de imagens usando um fotomicroscópio Leica Application Suite 4.9.0. Imagens histológicas de polpa branca foram medidas em 10 campos usando uma objetiva de 10× e o software ImageJ[®] 1.47v–2012 (Bethesda, MD, EUA) (PAPADOPULOS et al., 2007).

2.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism GraphPad Software Inc. San Diego, CA, EUA. O teste de análise de variância de Kruskal-Wallis foi usado para comparar animais não imunizados, tratados com mAhC e imunizados (em relação à eficiência da imunização). Os seguintes parâmetros foram comparados: o número de animais sobreviventes de acordo com as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foi usado com o teste de log-rank (teste de Mantel-Cox) e aqueles com sintomas, contagem de glóbulos brancos e produção de IgG. Danos histopatológicos e expansão da polpa branca foram usados para

comparar animais não imunizados versus animais tratados com adjuvante e não imunizados versus animais imunizados. O nível de significância foi $p < 0,05$ e incluímos o intervalo de confiança de 95%. O teste t foi utilizado para comparações de médias de parâmetros experimentais.

3. RESULTADOS

3.1 Modelo de infecção de sepse usando *A. baumannii* em camundongos não tratados com CY.

As curvas de sobrevivência de camundongos após a inoculação com uma cultura ativa de *A. baumannii* revelaram porcentagens correspondentes a 100%, 50% e 0% quando as suspensões ativas foram inoculadas por via intraperitoneal a 10^{-3} (OD₆₀₀ 0,02), 10^{-2} (OD₆₀₀ 0,15) e 10^{-1} (OD₆₀₀ 1,24), respectivamente, $p < 0,01$ (Figura 1A). Em seguida, foram realizadas infecções em camundongos utilizando cultura de *A. baumannii* a 10^7 – 10^9 UFC/mL. Após as primeiras 24 h, infecção por *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ CFU/mL) camundongos apresentaram 75% de letalidade, sendo esta dose utilizada para as avaliações da eficácia da vacina (Figura 1B), $p < 0,001$.

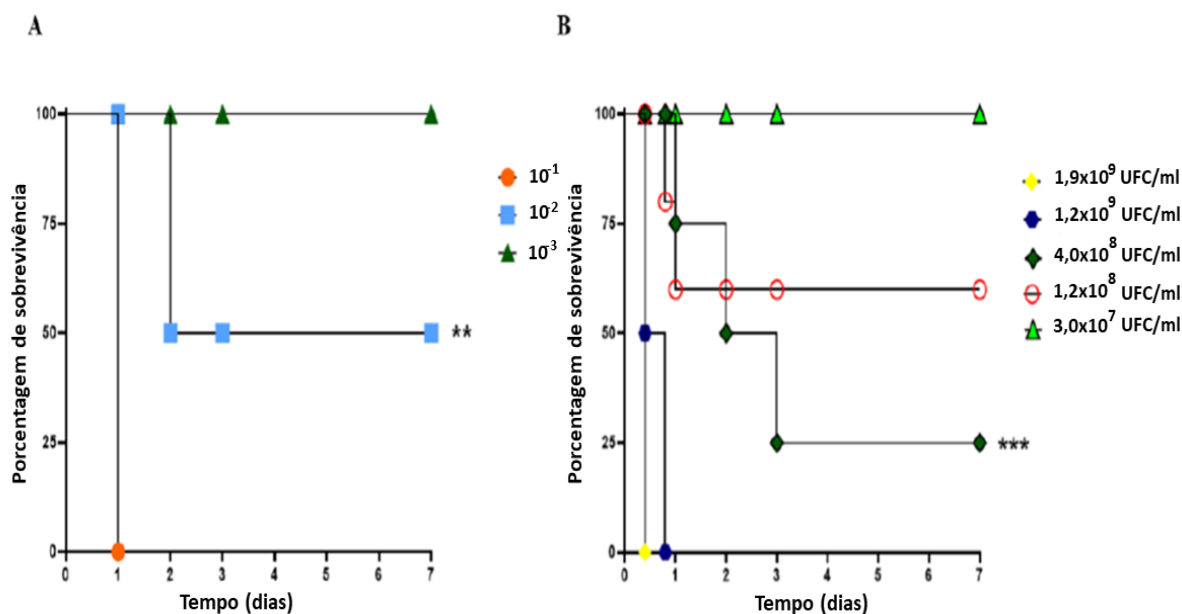


Figura 1. Determinação da dose letal de *A. baumannii* em camundongos não tratados com CY. (A) A taxa de sobrevivência de camundongos submetidos ao desafio bacteriano usando diluição em série variou de 10^{-1} a 10^{-3} . (**) $p < 0,01$. (B) Curva de sobrevivência de camundongos submetidos ao desafio bacteriano utilizando unidade formadora de colônia (UFC/mL de *A. baumannii*). Os valores de p determinados pelas curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier foram usados com o teste de log-rank (teste de Mantel–Cox, com seis animais por grupo). (***) $p < 0,001$. Camundongos imunizados tratados com CY.

3.2 Determinação da dose de mAhC em camundongos não tratados com CY

Camundongos (camundongos não tratados com CY) inoculados com uma ou mais doses de mAhC apresentaram ganho de peso corporal (Figura 2A). Entretanto, após a inoculação com a dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL), foram observadas diferenças nas porcentagens de sobrevivência, sendo a maior taxa de sobrevivência obtida quando maior número de doses foi aplicado (Figura 2B). Nenhum sobrevivente foi observado após um teste de desafio com *A. baumannii* em camundongos não tratados com CY que receberam uma dose única de mAhC ou foram administrados apenas 1,6 mg/mL de solução de hidróxido de alumínio. Camundongos não tratados com CY inoculados com duas ou três doses mostraram uma taxa de sobrevivência de 45% ($p < 0.01$), sugerindo o potencial estímulo e proteção de mAhC (Figure 2B).

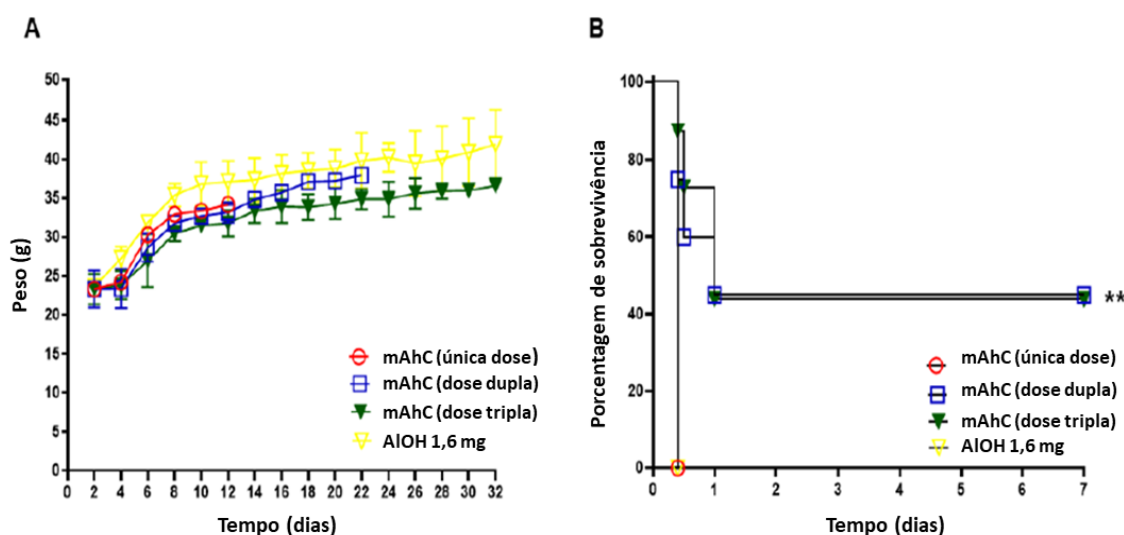


Figura 2. Determinação do número de doses de mAhC em camundongos não tratados com CY. (A) Monitoramento do peso corporal de camundongos não tratados com CY. Os dados são expressos como média e desvio padrão. $p < 0,05$. (B) Curva de sobrevivência de camundongos submetidos ao desafio com *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL). O teste de log-rank (teste de Mantel-Cox, com seis animais por grupo) determinou o valor- p . (**) $p < 0,01$.

3.3 Acoplamento Molecular de mAhC e Lipopolissacarídeo Bacteriano

Os modelos selecionados para modelagem de homologia são mostrados, destacando as identidades e os resultados da validação com os correspondentes valores favorecidos de Ramachandran e QMEAN (Tabela 1). A quitosana se complexou com o receptor e formou várias interações com energias de afinidade variadas, conforme indicado pelos ensaios de

acoplamento (Tabela 2). O ligante quitosana apresentou melhor energia de afinidade com o alvo *Acinetobacter baumannii* em -8,4 kcal/mol. O complexo formado entre o ligante quitosana e o receptor alvo LPS do organismo *A. baumannii* apresenta forte interação com os aminoácidos do receptor (Figura 3A). Este complexo apresentou interações entre o alvo e o ligante do tipo: van der Waals, ligação de hidrogênio convencional, ligação carbono-hidrogênio e ligação de hidrogênio doador pi (Figura 3B).

Tabela 1. O modelo alvo do lipopolissacarídeo de *A. baumannii* foi utilizado para analisar o acoplamento molecular com quitosana

Organismo	Alvo (base de dados Uniprot)	Modelo	Identidade (%)	Ramachandran Favorecido (%)	QMEAN
<i>A. baumannii</i>	LPS (D0C7T1)	5IV8	34,02%	90.54%	0.56

Tabela 2. Resultados do acoplamento molecular para complexos entre a quitosana e o alvo de *A. baumannii*.

Organismo	Ligante	Energia de afinidade (Kcal/mol)
<i>A. baumannii</i>	Quitosana	-8.4

3.4 Modelo imunossupressor

Estabelecemos um modelo imunossupressor em camundongos Swiss utilizando doses de CY, um agente com propriedades imunossupressoras que causa diminuição dos parâmetros hematológicos no sangue e leucopenia. A CY promoveu uma mudança progressiva no quadro clínico após três doses, causando pelos eriçados, queda de pelos e perda de peso ($p < 0,05$) (Figura 4A). Além disso, cerca de 70% dos camundongos tratados com CY sobreviveram ao experimento com uma recuperação gradual no ganho de peso corporal (Figura 4B). Além disso, esses animais apresentaram redução exacerbada no número de leucócitos totais, 79% ($p < 0,001$), (Figura 4C), neutrófilos ($p < 0,01$) (Figura 4D), linfócitos ($p < 0,001$) (Figura 4E), e monócitos ($p < 0,05$) (Figura 4F), em comparação com o grupo de camundongos não tratados. A redução de eritrócitos também foi evidenciada com declínio de 51% em relação ao grupo de

camundongos tratados com CY ($p < 0.01$) (Figura 4G) queda na concentração de hemoglobina ($p < 0.05$) (Figura 4H) e hematócrito ($p < 0.05$) (Figura 4I).

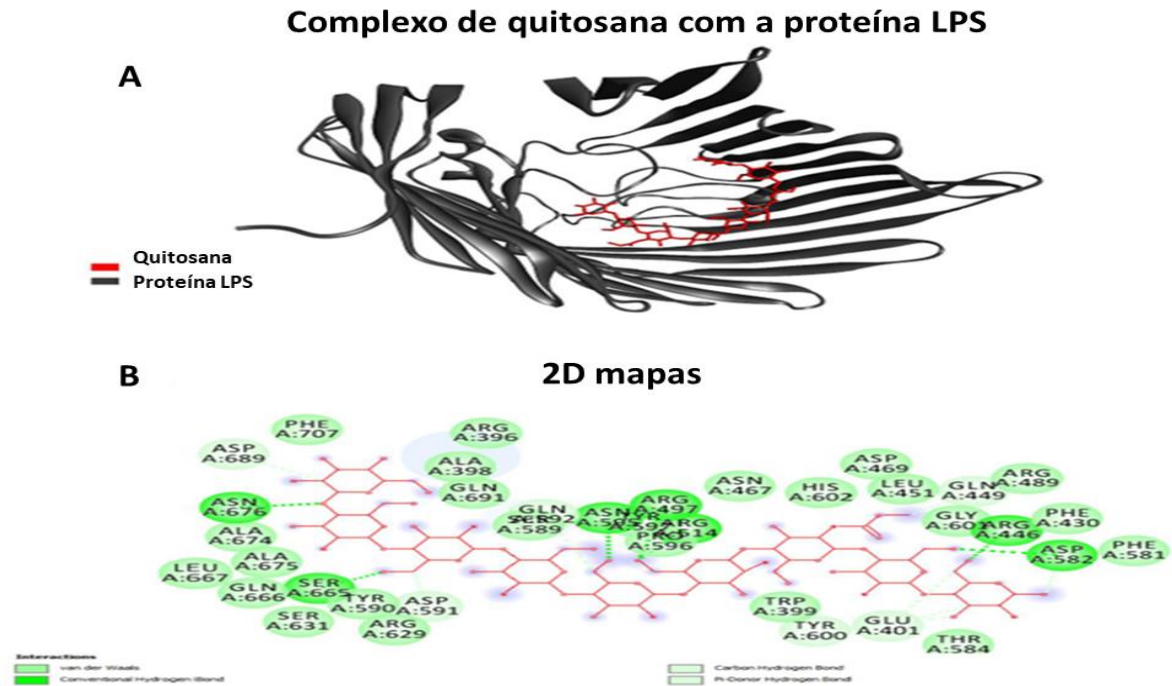


Figura 3. Cálculos de acoplamento molecular. (A) Quitosana (vermelha) complexada com proteína LPS (cinza). (B) mapas 2D de interações moleculares com aminoácidos de *A. baumannii*.

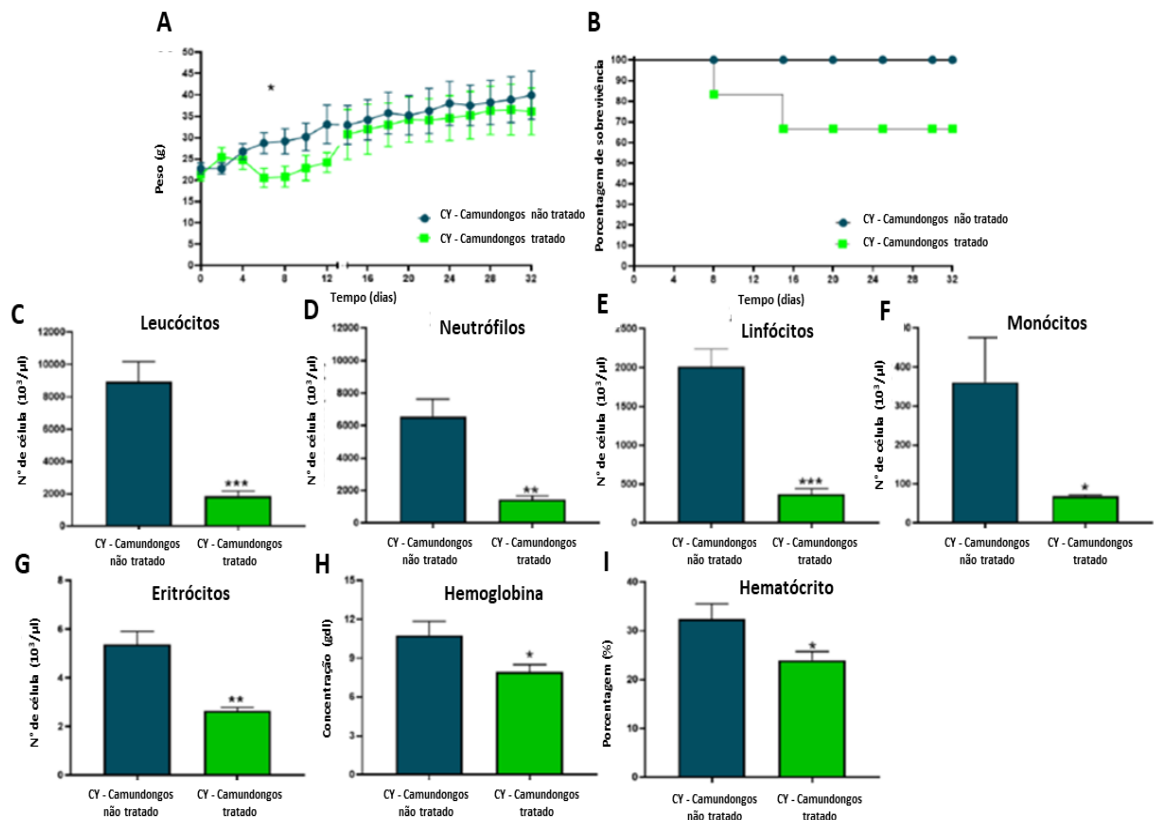


Figura 4. Descrição do modelo imunossupressor de camundongos Swiss. (A) Monitoramento do peso corporal de camundongos tratados com CY e não tratados com CY usando seis animais

por grupo. Os dados estão expressos em média e desvio padrão, (*) $p < 0,05$. (B) Porcentagem de sobrevivência de camundongos tratados com CY usando ciclofosfamida (150 mg/kg). (C) Números de leucócitos. (***) $p < 0,001$. (D) O número de neutrófilos. (**) $p < 0,01$. (E) números linfócitos. (***) $p < 0,001$. (F) números de monócitos. (*) $p < 0,05$. (G) números eritrócitos. (**) $p < 0,01$. (H) Hemoglobina. (*) $p < 0,05$. (I) Hematócrito. (*) $p < 0,05$. Os valores de p foram determinados pelo teste t .

3.5 Efeito protetor da vacina de células inteiras de *A. baumannii* inativada e adsorvida em mAhC em camundongos tratados com CY

A análise da resposta humoral pós-imunização revelou maior estimulação dos níveis de IgG em camundongos tratados com CY inoculados apenas com mAhC (grupo adjuvante) em comparação com camundongos tratados com CY não imunizados ($p < 0.05$) (Figura 5). No entanto, camundongos tratados com CY imunizados com vacina de célula inteira inativada de *A. baumannii* adsorvida com mAhC apresentaram níveis de IgG significativamente maiores do que os níveis obtidos de camundongos tratados com CY no grupo adjuvante ($p < 0,05$), sugerindo uma maior capacidade de estimular o resposta imune contra *A. baumannii* (Figura 5).

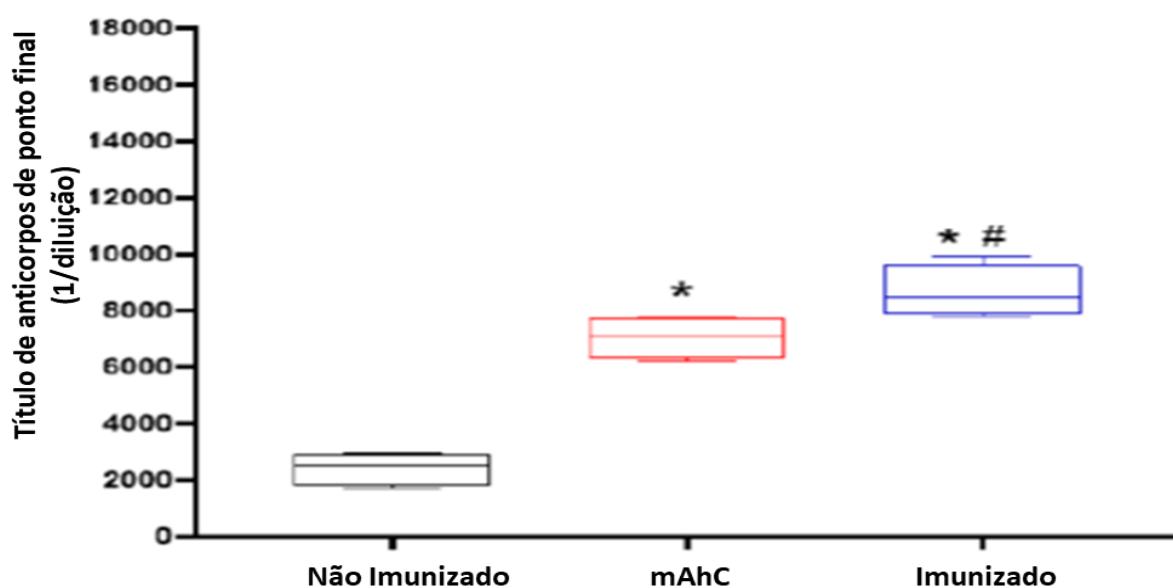


Figura 5. Estimulação da resposta humoral da vacina inativada de células inteiras de *A. baumannii* adsorvida em mAhC em camundongos tratados com CY. Os dados referem-se aos níveis de IgG total produzidos antes da aplicação de uma dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ CFU/mL) em camundongos imunizados tratados com CY, camundongos não imunizados tratados com CY e camundongos tratados com CY inoculados com mAhC usando 6 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC usando 6 animais por grupo. (*#) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC.

O estudo da eficácia da vacina após a aplicação da dose letal de *A. baumannii* ativo (4×10^8 UFC/mL) revelou uma taxa de letalidade de 100%, correspondendo a camundongos não imunizados e tratados com CY (grupo controle) ($p < 0,001$). Em contraste, em camundongos imunizados tratados com CY, a taxa de sobrevivência foi de 85%, um valor que diferiu das porcentagens de sobrevivência de camundongos tratados com CY no grupo mAhC (adjuvante) (45%) ($p < 0,05$) (Figura 6 A). Além disso, camundongos imunizados tratados com CY apresentaram níveis mais elevados de IgG em comparação com os grupos controle e adjuvante (Figura 6 B) ($p < 0,05$), bem como uma expansão mais significativa da polpa branca (Figura 6C,D).

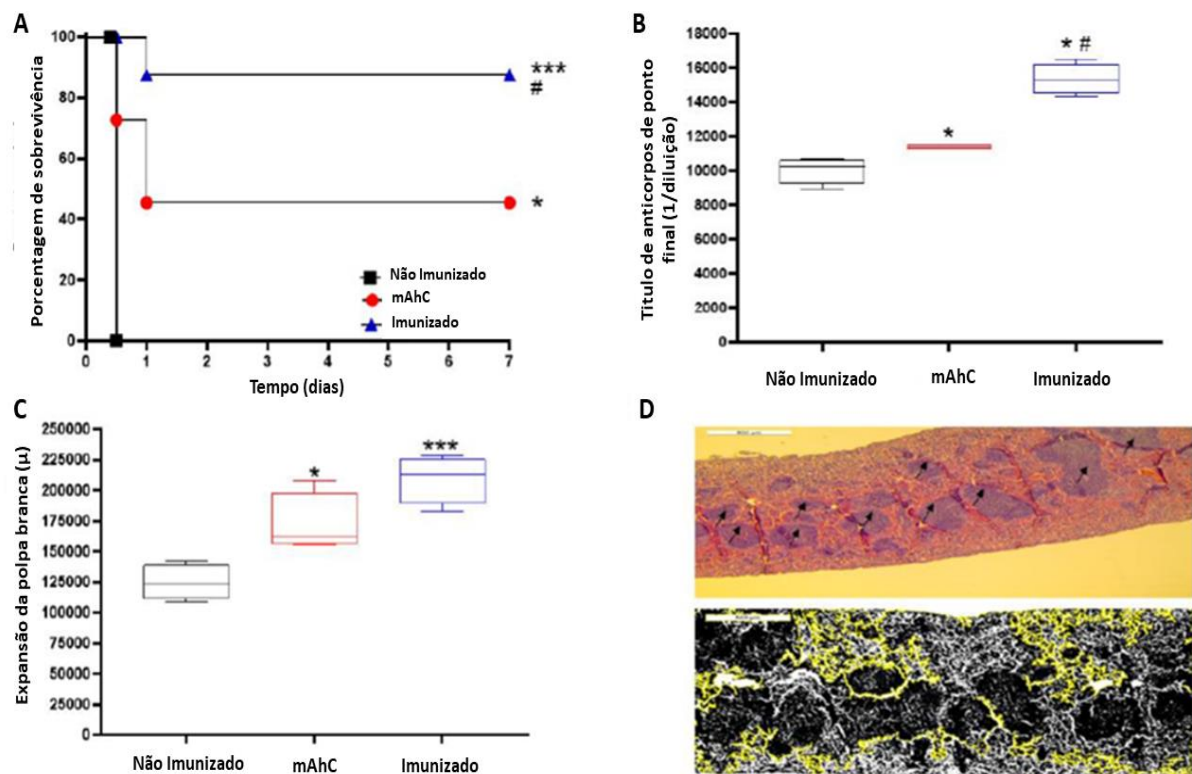


Figura 6. Teste de eficiência da vacina de célula inteira inativada e adsorvida em mAhC em camundongos tratados com CY. (A) Curva de sobrevivência de grupos experimentais utilizando camundongos tratados com CY após dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL). O teste de log-rank (teste de Mantel-Cox, com seis animais por grupo) determinou o valor- p . (*) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC usando seis animais por grupo. (***) $p < 0,001$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos imunizados tratados com CY e (#) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC. (B) Resposta humoral após dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL). Os dados referem-se aos níveis totais de IgG produzidos a partir de camundongos tratados com CY imunizados, camundongos tratados com CY não imunizados e camundongos tratados com CY com mAhC. (*) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC e camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos imunizados tratados com CY. $p < 0,05$ (*#) representa uma análise comparativa entre camundongos

imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC. (C , D) Medição e imagem da expansão da polpa branca de camundongos imunossuprimidos. (*) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY versus aqueles inoculados com mAhC. (***) $p < 0,01$ representa uma análise comparativa entre camundongos imunizados tratados com CY vs. camundongos tratados com CY inoculados com mAhC. O software ImageJ está disponível (<https://imagej.nih.gov/ij/> acessado em 31 de janeiro de 2023).

3.6 Análise histopatológica do modelo de sepse da infecção por *A. baumannii* em camundongos tratados com CY

O modelo de sepse de infecção por *A. baumannii* mostrou dano tecidual no fígado, baço e pulmões em camundongos imunizados, camundongos não imunizados e mAhC, tratados com CY (Figura 7). Em comparação, não houve diferenças significativas entre os pesos do fígado e dos pulmões desses grupos (Figura 7 A,B).

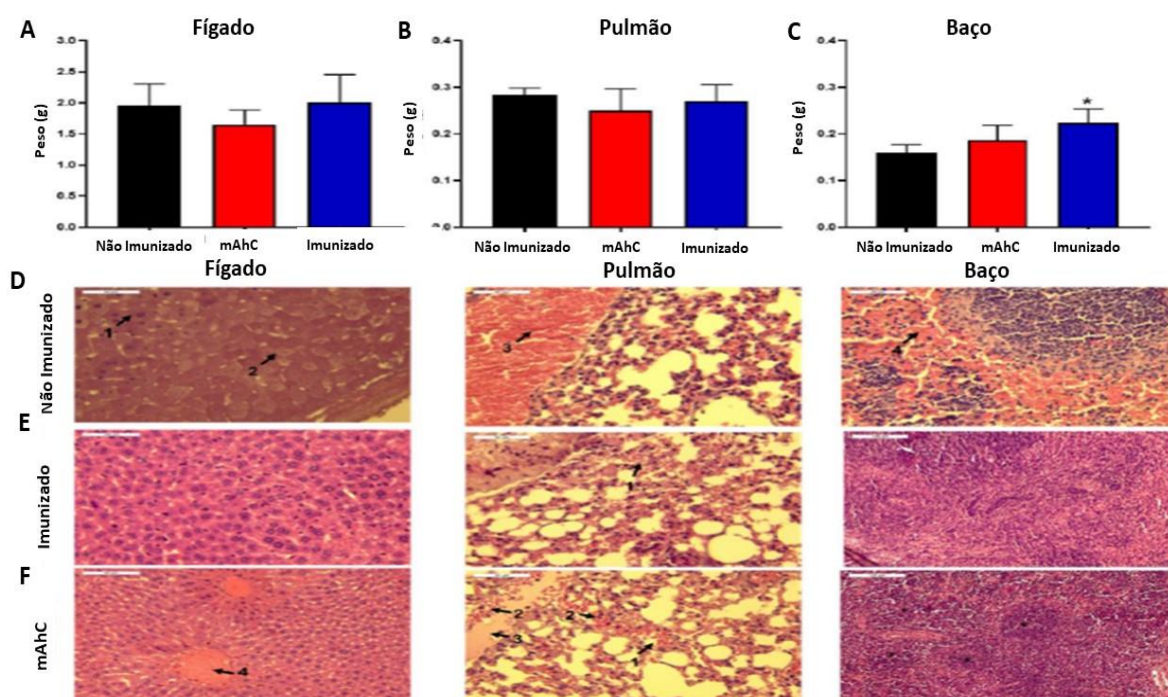


Figura 7. Achados histopatológicos da infecção por *A. baumannii* em camundongos tratados com CY. (A – C) Determinação dos pesos do, fígado, pulmão e baço de camundongos tratados com CY após a aplicação de uma dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL) usando 6 animais por grupo. Os dados são expressos como média e desvio padrão. (*) $p < 0,05$ representa uma análise comparativa entre camundongos não imunizados tratados com CY vs. camundongos imunizados tratados com CY. (D – F) Achados histopatológicos de grupos experimentais utilizando camundongos tratados com CY após aplicação de dose letal de *A. baumannii* ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL) corado pela técnica de hematoxilina-eosina. Dados: D1: necrose (40×), D2: Degeneração hidrópica (40×), D3: hiperemia (40×), D4: hemorragia (40×), E1: hemorragia (40×), F1: hemorragia pulmonar (40×), F2: neutrófilos polimorfonucleares (40×), F3: inflamação aguda (40×), F4: hiperemia (40×), F* polpa branca.

Em termos de peso dos baços de camundongos imunizados tratados com CY, houve diferenças significativas em relação aos grupos não imunizados tratados com CY ou adjuvantes ($p < 0,05$) (Figura 7C). Além disso, uma expansão mais substancial da polpa branca foi observada neste grupo ($p < 0,01$) e no grupo adjuvante ($p < 0,05$) (Figura 7D). A expansão da polpa branca está relacionada à presença de hiperplasia periarteriolar e folicular causada pelo estímulo antigênico e resposta imune (Figura 6D e 7D). Os achados histopatológicos revelaram maior gravidade no fígado com degeneração hidrópica e sinusóides diminuídos, e pneumonia intersticial com infiltrado inflamatório misto e congestão (de menor gravidade nos grupos mAhC e imunizados) no pulmão. Além disso, hemorragia, congestão e hiperplasia linfóide da polpa branca foram detectadas no baço (Figura 7D).

4. DISCUSSÃO

A. baumannii é um patógeno emergente crítico que é responsável pela pneumonia nosocomial em ambientes de saúde; tornou-se uma emergência global (ALOS 2014; BOREK et al., 2019; MIRANDA et al., 2021). Modelos murinos contribuíram para elucidar os mecanismos associados à patogênese e compreender a relação patógeno-hospedeiro de infecções causadas por *A. baumannii* em modelos de sepse, pneumonia e imunossupressão (CANGUSSU et al., 2018; FELIX et al., 2019; TSAI et al., 2021). A CY é um agente antineoplásico sintético amplamente utilizado como droga imunossupressora em camundongos, que causa efeito citostático e inibe o ciclo rápido das células imunes, causando consequentemente granulopenia (DIEHL et al., 2017; LIU et al., 2020; DOLLERY et al., 2021). Camundongos infectados com *A. baumannii* podem apresentar alterações consistentes com pneumonia, inflamação aguda com infiltração inflamatória leve a grave de células polimorfonucleares, formação de abscesso segmentar e infiltração leve a moderada de macrófagos alveolares quando tratados com um imunossupressor (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2000). Aqui, usamos um modelo de sepse por *A. baumannii* em camundongos tratados com CY para entender o comportamento de cepas multirresistentes em infecções e avaliar novas estratégias vacinais baseadas em cepas bacterianas inativadas adsorvidas em mAhC.

Preliminarmente, revelamos a imunossupressão de camundongos imunocompetentes que apresentavam sinais de infecção e apresentavam pêlos eriçados e com queda de pelos, perda de peso corporal e letargia, acompanhada de redução de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos), eritrócitos e hemoglobina e a percentagem de hematócrito (Figura 4). Nossos dados

corroboram os de outros estudos que mostram baixas concentrações de polimorfonucleares neutrófilos circulantes, seguidas de aumento acentuado e progressivo levando a maior suscetibilidade de camundongos imunossuprimidos (JIN et al., 2011; HARRIS et al., 2019; DOLLERY et al., 2021) e distintas alterações de macrófagos e linfócitos com menor participação na primeira horas de infecção, seguidas pelos níveis basais.

A expansão da área folicular é caracterizada pelo aumento da celularidade das membranas nucleares arredondadas e regulares estimuladas pela imunização, levando à subsequente proliferação de células B (SUTTIE 2006; ELMORE et al., 2006; McCONNELL et al., 2010; CANGUSSU et al., 2018). O presente estudo revelou a expansão da polpa branca do baço nos grupos de camundongos imunizados tratados com CY com a produção de anticorpos IgG. Além disso, a proteção adequada de 85% após uma dose letal de *A. baumannii* multirresistente sugere que nosso modelo murino foi eficaz na proteção vacinal em animais imunizados (Figura 6BC), conforme relatado em estudos anteriores (McCONNELL et al., 2010; LUO et al., 2012; DOLLERY et al., 2021).

Outro aspecto relevante aqui observado foi a maior proteção tecidual dos grupos de camundongos tratados com CY imunizados, pois camundongos tratados com CY não imunizados ou tratados com CY inoculados com adjuvante apresentaram achados histopatológicos de edema, hemorragia, degeneração hidrópica, necrose e hiperemia em cortes hepáticos, assim como edema, hemorragia e hiperemia em cortes pulmonares. Houve sinais de infecção aguda nos grupos de camundongos tratados com CY não imunizados e tratados com CY inoculados com adjuvante após a infecção, revelando sinais característicos da patologia com morte em 24 h. Em contraste, os grupos de camundongos imunizados tratados com CY mostraram proteção adequada após receberem uma dose letal de *A. baumannii* resistente a múltiplas drogas. Nossos dados corroboram estudos de infecção anteriores em modelos de sepse murina (HARRIS et al., 2013; He et al., 2015; NA et al., 2019).

Alterações esplênicas causadas por infecções por *A. baumannii* são acompanhadas por danos à polpa branca, apoptose leucocitária, formação de êmbolos, aglomerados de leucócitos degenerados ou necróticos nas áreas da polpa branca e aparecimento de congestão moderada na região medular (HARRIS et al., 2013; KETTER et al., 2014). A infiltração de células inflamatórias mistas no espaço perivascular e peribrônquico, com presença de granulócitos polimorfonucleares e células mononucleares no lúmen das vias aéreas, principalmente nas primeiras horas de infecção, é acompanhada de vasodilatação, congestão e hemorragia, que leva à destruição das vias aéreas. estruturas alveolares do pulmão após 48 h de infecção (HARRIS et al., 2013; HE et al., 2015; KUOLEE et al., 2015; NA et al., 2019; BERGAMINI et al., 2021). Nossos achados histopatológicos destacam a importância e adequação do modelo de sepse,

evidenciando a proteção vacinal, o estímulo da resposta imune e a consequente proteção tecidual do fígado, baço e pulmão dos animais imunizados.

O mAhC usado aqui contribuiu para a estimulação da produção de IgG de grupos de camundongos imunizados tratados com CY e foi superior aos grupos de camundongos não imunizados tratados com CY quando usado em três doses/animal. Estudos anteriores demonstraram a estimulação da produção de IgG em camundongos imunizados usando antígenos proteicos adsorvidos exclusivamente em quitosana (SARI et al., 2016; GILAVAND et al., 2020; DU et al., 2021), ou exclusivamente em hidróxido de alumínio ou adjuvante de Freund (McCONNELL et al., 2010; RAMEZANALIZADEH et al., 2020; PULIDO et al., 2020). No entanto, o presente estudo é o primeiro a associar hidróxido de alumínio e quitosana para a adsorção de *A. baumannii* antígenos em mAhC, revelando um adjuvante vacinal que estimula a resposta do sistema imunológico de camundongos imunossuprimidos.

Apesar da relevância da eficácia de uma nova formulação de vacina com *A. baumannii* multirresistente inativado que é adsorvido em células inteiras em mAhC, permanecem questões que não foram totalmente elucidadas. Conforme descrito aqui, registramos alta estimulação da resposta imune medindo os níveis totais de IgG. No entanto, não determinamos os níveis de IgG1 e IgG2c, que participam da eliminação de patógenos e redução das cargas bacterianas pós-operatórias (SHU et al., 2016; CANGUSSU et al., 2018; RAMEZANALIZADEH et al., 2020). Não medimos perfis de citocinas, o que pode ser necessário para elucidar o mecanismo de eliminação do patógeno e proteção vacinal. Assim, estudos futuros devem abordar essas questões.

5. CONCLUSÕES

Demonstramos o papel de um modelo de sepse por *A. baumannii* em camundongos e a redução no número de neutrófilos antes da imunização (tratados com CY). A vacina multidroga inativada e adsorvida de células inteiras de *A. baumannii* (mAhC) estimulou a resposta imune e protegeu os animais imunizados, mesmo após um desafio com uma dose letal. Esses achados fornecem a base para estudos sobre como minimizar os impactos das infecções por *A. baumannii*.

REFERÊNCIAS

- ALOS, J.I. Antibiotic resistance: A global crisis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- BERGAMINI, G.; PERICO, M. E.; DI PALMA, S.; SABATINI, D.; ANDREETTA, F.; DEFAZIO, R.; FERRARI, L. Mouse pneumonia model by *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant strains: Comparison between intranasal inoculation, intratracheal instillation and oropharyngeal aspiration techniques. **PloS one**, v. 16, n. 12, p. e0260627, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260627>.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350. 2011 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.
- BIOVIA, D.S. Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017; Dassault Systemes: San Diego, CA, USA, 2017.
- BOREK A.J.; WANAT, M.; SALLIS, A.; ASHIRU-OREDOPE D.; ATKINS, L.; BEECH, E.; TONKIN-CRINE, S. How can national antimicrobial stewardship interventions in primary care be improved? A stakeholder consultation. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 207, 2019. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040207>
- BRANDI, I. V.; MOZZER, O. D.; VANDER JORGE, E.; PASSOS, F. J. V.; PASSOS, F. M. L.; CANGUSSU, A. S. R.; SOBRINHO, E. M. Growth conditions of clostridium perfringens type B for production of toxins used to obtain veterinary vaccines. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 37, p. 1737-1742, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1146-0>
- BRASIL, *Instrução normativa 23 M.A.P.A.* Diário Oficial da União, v. 23, 2002. Available at <https://www.in.gov.br/servicos/diario-oficial-da-uniao> in 01/31/2023.
- BRITO, H.S.; ALENCAR, F.C.; ALBURQUERQUE, B.; SILVA, M.G.; FÉLIX, M.K.C.; MULHOLLAND, D.S.; OLIVEIRA, E.E.; MARIÚBA, L.A.M.; SANTOS, E.M.S.; BRANDI, I.V.; LOBATTO, F.C.F.; CANGUSSU, A.S.R. Pathologic findings on ruminant enteric clostridial diseases reveal specificities and differences among iota and iota-like toxins. **Rev. Cienc. Agríc.**, v. 38, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.22267/rcia.213802.154>.
- CABRAL, M.P.; GARCÍA, P.; BECEIRO, A.; RUMBO, C.; PÉREZ A.; MOSCOSO, M.; BOU G. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. **Nat. Commun.**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms15480>.
- CANGUSSU, A.S.R.; MARIÚBA, L.A.M.; LALWANI, P.; PEREIRA, K.D.; ASTOLPHI-FILHO, E.S.; ORLANDI, P.P.; NOGUEIRA, P.A. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. **Vet. Res.**, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0503-4>
- CASTILHO, S. R. A.; GODOY, C. S. D. M.; GUILARDE, A. O.; CARDOSO, J. L.; ANDRÉ, M. C. P.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS One**, v. 12, n. 5, Article ID e0176790, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>

CHEN, W. Host innate immune responses to *Acinetobacter baumannii* infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 10, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00486>.

DIEHL, R.; FERRARA, F.; MÜLLER, C.; DREYER, A. Y.; MCLEOD, D. D.; FRICKE, S.; BOLTZE, J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 14, n. 2, p. 146-179, 2017. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.39>

DOLLERY, S.J.; ZURAWSKI, D.V.; GAIDAMAKOVA, E.K.; MATROSOVA, V.Y.; TOBIN, J.K.; WIGGINS, T.J.; TOBIN, G. J. Radiation-Inactivated *Acinetobacter baumannii* Vaccine Candidates. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 96, 2021. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020096>

DU, X.; XUE, J.; JIANG, M.; LIN, S.; HUANG, Y.; DENG, K.; FENG, G. A multiepitope peptide, rOmp22, encapsulated in chitosan-PLGA nanoparticles as a candidate vaccine against *Acinetobacter baumannii* infection. **Int. J. Nanomedicine**, v. 16, p. 1819. 2021. <https://doi.org/10.2147/IJN.S296527>.

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicol. Pathology**, v. 34, n. 5, p. 648-655, 2006. <https://doi.org/10.1080/01926230600865523>.

FELIX, M. K. C.; DEUSDARÁ, T. T.; SANTOS, L. S. S.; AGUIAR, R. W. S.; CORRÊA, R. F. T.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S. R. Inactivated alpha toxin from *Clostridium novyi* type B in nano-emulsion protect partially protects Swiss mice from lethal alpha toxin challenge. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/doi:10.1038/s41598-019-50683-2>.

GARCÍA-QUINTANILLA, M.; PULIDO, M.R.; PACHÓN, J.; MCCONNELL, M.J. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. **PLoS One**, v. 9, n. 12, Article ID e114410, 2014. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0114410>.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 2, p. 106-119, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.013>.

GILAVAND, F.; MARZBAN, A.; EBRAHIMPOUR, G.; SOLEIMANI, N.; GOUDARZI, M. Designation of chitosan nano-vaccine based on MxiH antigen of *Shigella flexneri* with increased immunization capacity. **Carbohydr. Polym.**, v. 232, p. 115813, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115813>

HAAS, J.; BARBATO, A.; BEHRINGER, D.; STUDER, G.; ROTH, S.; BERTONI, M.; MOSTAGUIR, K.; GUMIENNY, R.; SCHWEDE, T. Continuous Automated Model Evaluation (CAMEO) complementing the critical assessment of structure prediction in CASP12. **Proteins**, v. 86, p. 387–398, 2018, <https://doi.org/10.1002/prot.25431>

HARRIS, G.; KUOLEE, H.; XU H.H.; CHEN, W. Acute intraperitoneal infection with a hypervirulent *Acinetobacter baumannii* isolate in mice. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 1-12. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43000-4>

HARRIS, G.; KUOLEE, R.; LAM, C. K.; KANZAKI, G.; PATEL, G. B.; XU, H. H.; CHEN, W. A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 57, n. 8, p. 3601-3613, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.00944-13>

HE, S.; HE, H.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; WANG, W.; YU, D. In vitro and in vivo analysis of antimicrobial agents alone and in combination against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.*, v. 6, p. 507, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00507>

IKEZAWA, Y.; NAKAZAWA, M.; TAMURA, C.; TAKAHASHI, K.; MINAMI, M.; IKEZAWA, Z. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci.*, v. 39, n. 2, p. 105– 112, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.02.002>

JIN, J.S.; KWON, S.O.; MOON, D.C.; GURUNG, M.; LEE, J.H.; KIM, S.I.; LEE J.C. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PloS one*, v. 6, n. 2, Article ID e17027, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017027>.

JIN, P.; SUN, F.; LIU, Q.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; LIU, X. An oral vaccine based on chitosan/aluminum adjuvant induces both local and systemic immune responses in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vaccine*, v. 39, n.51, p. 7477-7484, 2021. <https://doi.org/doi:10.1016/j.vaccine.2021.10.063>

KETTER, P. M.; GUENTZEL, M. N.; SCHAFFER, B.; HERZIG, M.; WU, X.; MONTGOMERY, R. K.; ARULANANDAM, B. P. Severe *Acinetobacter baumannii* sepsis is associated with elevation of pentraxin 3. *Infect. Immun.*, v. 82, n. 9, p. 3910-3918, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01958-14>

KUOLEE, R.; HARRIS, G.; YAN, H.; XU, H. H.; CONLAN, W. J.; PATEL, G. B.; CHEN, W. Intranasal immunization protects against *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia in mice. *Vaccine*, v. 33, n. 1, p. 260-267, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.083>

KYRIAKIDIS, I.; VASILEIOU, E.; PANA, Z.D.; TRAGIANNIDIS, A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, v. 10, n. 3, p. 373, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>

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. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 7, p. 55. 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.

LESHO, E.; EUN-JEONG, Y.; MCGANN, P.; SNESRUD, E.; KWAK, Y.; MILILLO, M.; ONMUS-LEONE, F.; PRESTON, L.; ST CLAIR, K.; NIKOLICH, M.; VISCOUNT, H.; WORTMANN, G.; ZAPOR, M.; GRILLOR-COURVALIN, C.; COURVALIN, P.; CLIFFORD, R.; WATERMAN, P. E. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J. Infect. Dis.*, v. 208, n. 7, p. 1142-51, 2013. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit293>

LIN, C. Y.; CHEN, Y. M.; LIN, M. C.; CHANG, Y. P.; CHAO, T. Y.; WANG, C. C.; TSAI, Y. L.; SHEN, L. S.; LI, C. L.; LIN, A. S. Risk factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* recurrence after successful eradication in ventilated patients. **biomedical journal**, v. 39, n. 2, p. 130-138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.07.001>

LIU, A. R.; DU, W. J.; XIE, J. F.; XU, J. Y.; HUANG, Y. Z.; QIU, H. B.; YANG, Y. Role of immunodeficiency in *Acinetobacter baumannii* associated pneumonia in mice. **Chin. Med.**, v. 133, n. 18, p. 2161, 2020. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001027>

LUO, G.; LIN, L.; IBRAHIM, A.S.; BAQUIR, B.; PANTAPALANGKOOR, P.; BONOMO, R.A.; SPELLBERG, B. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. **PloS one**, v. 7, n.1, Article ID e29446, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029446>.

MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. infect.**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>

MCCONNELL, M.J.; PACHÓN, J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.052>

MIRANDA, C.; SILVA, V.; IGREJAS, G.; POETA, P. Impact of European pet antibiotic use on enterococci and staphylococci antimicrobial resistance and human health. **Fut. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 185-203, 2021. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0119>.

MOURA, W.S.; SOUZA, S.R.; CAMPOS, F.S.; CANGUSSU, A.S.R.; SANTOS, E.M.S.; ANDRADE, B.S.; VIANA, K.F.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E.E.; NASCIMENTO, V.L. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Ind. Crops Prod.**, v. 46, p. 112142. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112142>.

MUNIER, A. L.; BIARD, L.; LEGRAND, M.; ROUSSEAU, C.; LAFAURIE, M.; DONAY, J. L.; MOLINA, J. M. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. **International J. Infect. Dis.**, v. 79, p. 179-184, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.371>

NA, S. H.; OH, M. H.; JEON, H.; LEE, Y. K.; LEE, B.; SHIN, M.; LEE, J. C. Imaging of bioluminescent *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. **Microb. Pathog.**, v. 137, p. 103784, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103784>

PAPADOPULOS, F.; SPINELLI, M.; VALENTE, S.; FORONI, L.; ORRICO, C.; PASQUINELLI, G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using image J. **Ultrastruct Pathol.**, v. 31, n. 6, p. 401-407, 2007. <https://doi.org/10.1080/01913120701719189>.

PULIDO, M. R.; GARCÍA-QUINTANILLA, M.; PACHÓN, J.; MCCONNELL, M. J. A Lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. **Vaccine**, v. 38, n. 4, p. 719-724, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.043>

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv. Protein Chem.**, v. 23, p. 283–437. 1968 [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60402-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60402-7).

RAMEZANALIZADEH, F.; OWLIA, P.; RASOOLI, I. Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*. **Vaccine**, v. 38, n.34, p. 5436-5446, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.052>.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, M. J.; PACHÓN, J.; PICHARDO, C.; CUBEROS, L., IBÁÑEZ-MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-CURIEL, A.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, M. E.. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, n. 4, p. 493-501, 2000. <https://doi.org/10.1093/jac/45.4.493>.

SANNER, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.*, v. 17, n. 1, p. 57–61, 1999.

SANTOS, E.M.S.; ALMEIDA, A. C.; SANTOS, H. O.; CANGUSSU, A.S.R.; COSTA, K.S.; ALVES, J.N.; BARBOSA, L.C.B.; AGUIAR, R.W.S. Mechanism of Brassica oleracea performance in bovine infectious mastitis by bioinformatic analysis. **Microb. Pathog.** v. 129, p. 19-29, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.029>

SARI, R. S.; ALMEIDA, A. C.; CANGUSSU, A. S. R.; JORGE, E. V.; MOZZER, D. O.; SANTOS, H. O.; QUINTILIO, W.; BRANDI, I. V.; ANDRADE, V. A.; MIGUEL, A. S. M.; SANTOS, E. M. S. Anti-botulism single-shot vaccine using chitosan for protein encapsulation by simple coacervation. **Anaerobe**, v. 42, p. 182-187, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.013>.

SCHRODINGER, L.L.C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0; Schrodinger, LLC: New York City, NY, USA, 2018.

SHU, M.H.; MATRAHIM, N.; NORAMDAN, N.; PANG, S.P.; HASHIM S.H.; PHOON, W.H.; ABUBAKAR, S. An inactivated antibiotic-exposed whole-cell vaccine enhances bactericidal activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep22332>

SOBRINHO, E. M.; CANGUSSU, A. S. R.; BRANDI, I. V.; SARI, R. S.; ALMEIDA, A. C.; COLEN, F.; QUINTILIO, W.; SANTOS, H. O. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for epsilon antitoxin determination in serum of immunized rabbits. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 138, n. 1-2, p. 129-133, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.007>

SUTTIE, A. W. Histopathology of the spleen. **Toxicol. Pathol.**, v. 34, n. 5, p. 466-503, 2006. <https://doi.org/10.1080/01926230600867750>

TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 31, n. 2, 2010455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

TSAI, C. Y.; HSIEH, S.C.; LIU, C.W.; LU, C.S.; WU,C.H.; LIAO, H.T.; CHEN, M.H.; LI, K.J.; SHEN, C.Y.; KUO, Y.M.; YU, C.L. Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils, Immune, and Non-Immune Cells via Released Cytokines, Granule Proteins, Microvesicles, and Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils. **Int. J.Mol. Sci.**, v. 22, n. 6, p. 3119, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22063119>

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F.T.; DE BEER, T.A.P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 46, n. 1, p. 296–3032018,. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.

WONG, D.; NIELSEN, T. B.; BONOMO, R. A.; PANTAPALANGKOOR, P.; LUNA, B.; SPELLBERG, B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>

YANG, Q.; RUI, Y. Two multiplex real-time PCR assays to detect and differentiate *Acinetobacter baumannii* and non-Baumannii *Acinetobacter* spp. carrying bla NDM, bla OXA-23-like, bla OXA-40-like, bla OXA-51-like, and bla OXA-58-like genes. **PloS one**, v. 11, n. 7, Article ID e0158958, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158958>

ZARRILLI, R.; POURNARAS, S.; GIANNOULI, M.; TSAKRIS, A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int. J. antimicrob. Agents**, v. 41, n. 1, pp. 11-19, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, por meio desses estudos, foi possível realizar inicialmente a caracterização de várias cepas potencialmente patogênicas obtidas em um ambiente de UTI hospitalar na região sul do estado. Essas cepas também demonstraram resistência a diversas classes de antimicrobianos clinicamente relevantes. Durante a análise, identificou-se um isolado pertencente ao gênero *Acinetobacter* spp., que apresentou positivo para o gene OXA-23. Além disso, outros dois isolados, *S. paucimobilis* e *B. circulans*, também foram previamente associados em estudos como agentes causadores de infecções hospitalares. Portanto, estudos como esse, que investigam fontes de contaminação e realizam a caracterização molecular de genes de resistência, são de extrema importância, pois fornecem conhecimento sobre os principais microorganismos presentes na unidade de saúde, além de contribuir para uma gestão mais segura dos antimicrobianos.

Com base nesse entendimento inicial dos microorganismos presentes, um estudo complementar foi realizado visando o desenvolvimento de uma vacina contra bactéria multirresistentes. Os resultados desse estudo evidenciaram que a vacina induziu um aumento na resposta imunológica, resultando em maior sobrevivência e proteção tecidual de camundongos. Além disso, a modelagem molecular do complexo quitosana e LPS bacteriano foi validada durante o estudo. Esses achados contribuem para o avanço das pesquisas voltadas à investigação de estratégias para minimizar os impactos das infecções por *A. baumannii*.

Para uma investigação mais abrangente dos mecanismos imunológicos envolvidos nas infecções por *A. baumannii*, são necessários estudos futuros. Essas pesquisas podem explorar de forma mais ampla o perfil das citocinas envolvidas nesse contexto.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFT.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Araguaína, 10 de junho de 2020.

O projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS IMUNOCOMPROMETIDOS IMUNIZADOS COM VACINA COMPOSTA DE CORPO BACTERIANO INATIVADO DE BMR ADSORVIDOS EM QUITOSANA E HIDROXIDO DE ALUMÍNIO" processo nº 23101.002359/2020-31 sob a responsabilidade, ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Atenciosamente,

Sandro Estevan Moron

Coordenador da CEUA/UFT

ANEXO B – ISOLADO CLÍNICO DE *A. baumannii* FORNECIDO PELO LACEN-TO.

 **GOVERNO DO
ESTADO DO
TOCANTINS** **SECRETARIA
DE SAÚDE**

Palmas, 10 de Dezembro de 2019.

Ao Senhor Alex Sander Rodrigues Cangassu
Assunto: Cepas Bacterianas – Projeto PPSUS

Conforme solicitado, estamos doando cepas de referência ATCC (American Type Culture Collection) e cepa não ATCC em tubos contendo ágar nutriente, para serem utilizadas no "Projeto de Análises de Susceptibilidade de bactérias multirresistentes PPSUS".

Devido a problemas com a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 produtora KPC positivo (blaKPC), a mesma será doada posteriormente, após contato prévio, com no mínimo uma (01) semana de antecedência, informando a data prévia para retirada e mediante confirmação do laboratório de bacteriologia.

O transporte, armazenamento, viabilidade e biossegurança dos isolados bacterianos são de responsabilidade do requerente. Abaixo segue a relação das cepas doadas com suas aplicações.

***Escherichia coli* ATCC 35218** - Aplicação: Controle de qualidade de discos contendo combinação de beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamase.

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853** - Aplicação: Testes de sensibilidade de pseudomonas a antimicrobianos.

***Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706** - Aplicação: Controle negativo para blaKPC.

Acinetobacter baumannii – Cepa oriunda de amostra clínica resistente aos carbapenêmicos. Positiva para bla OXA-23 e bla OXA-51 conforme análise realizada pela FIOCRUZ-RJ.

(documento assinado digitalmente)
Vanessa Fernandez Gonzalez Aires
Biomédica - Lacento
Laboratório de Bacteriologia

SVPPS/DLCSP/BM/BACT

Este documento foi assinado digitalmente por VANESSA FERNANDEZ GONZALEZ AIRES EM 10/12/2019 11:12:32. A autenticidade deste documento

ANEXO C -***Artigos publicados referente a Tese***

Original Article

Resistance determinants of emerging pathogens isolated from an intensive care unit as a parameter of population health conditions of the Legal Amazon microregion

Determinantes de resistência a patógenos emergentes isolados de uma unidade de terapia intensiva como parâmetro das condições de saúde da população da microrregião da Amazônia Legal

T. T. Deusdará^a , M. K. C. Felix^a , H. S. Brito^b , D. R. Ribeiro^b , E. W. S. Cangussu^b , B. Albuquerque^b , G. R. Santos^{a,b} , J. R. Chaves^c , W. C. R. Carvalho^c , S. Astolfi-Filho^d , E. N. Assunção^d , L. A. M. Mariúba^e , P. A. Nogueira^a , K. F. Viana^f , I. V. Brandi^g  and A. S. R. Cangussu^{a,b,c,*} 

^aUniversidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Gurupi, TO, Brasil

^bUniversidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Gurupi, TO, Brasil

^cUniversidade Federal do Tocantins, Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Gurupi, TO, Brasil

^dUniversidade Federal do Amazonas, Centro de Apoio Multidisciplinar, Manaus, AM, Brasil

^eFiocruz Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM, Brasil

^fUniversidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, PR, Brasil

^gUniversidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil

Abstract

Bacteria responsible for causing infections are common in hospital environments, water, soil, and food products. The infection risk is intensified by the absence of public sanitation, poor quality of life, and food scarcity. These external factors promote the dissemination of pathogens by direct contamination or biofilm formation. In this work, we identified bacterial isolates obtained from intensive care units in the southern region of Tocantins, Brazil. We compared matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) techniques and 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) molecular analysis; we also performed phenotypic characterization. Fifty-six isolates characterized using morphotintorial tests were classified as gram-positive (80.4%; n = 45) and gram-negative (19.6%; n = 11) and were resistant to several antibiotic classes; notably, we identified the *bla*_{OXA-23} resistance gene in the ILH10 isolate. Microbial identification using MALDI-TOF MS resulted in the identification of *Sphingomonas paucimobilis* and *Bacillus circulans*. 16S rRNA sequencing revealed four isolates belonging to the genera *Bacillus* and *Acinetobacter*. The similarity was superior to 99% for *Acinetobacter schindleri* in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), grouped in the clade superior to 90%. Several strains isolated from intensive care units (ICU) were resistant to various antibiotic classes. These techniques allowed for the identification of several microorganisms of importance in public health, enabling improvements in human infection control and proving the quality of inputs, food, and water.

Keywords: multi-drug resistant bacteria, hospital environment, MALDI-TOF MS, 16S rRNA.

Resumo

As bactérias responsáveis por causar infecções são comuns em ambientes hospitalares, água, solo e produtos alimentícios. O risco de infecção é intensificado pela ausência de saneamento público, má qualidade de vida e escassez de alimentos. Esses fatores externos promovem a disseminação de patógenos por contaminação direta ou formação de biofilme. Neste trabalho, identificamos isolados bacterianos obtidos de unidades de terapia intensiva na região sul do Tocantins, Brasil. Comparamos técnicas de espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e análise molecular de ácido ribonucleico ribossômico 16S (rRNA); também realizamos caracterização fenotípica. Cinquenta e seis isolados caracterizados por testes morfotintoriais foram classificados como gram-positivos (80,3%; n = 45) e gram-negativos (19,6%; n = 11) e foram resistentes a várias classes de antibióticos; notavelmente, identificamos o gene de resistência *bla*_{OXA-23} no isolado de ILH10. A identificação microbiana usando MALDI-TOF MS resultou na identificação de *Sphingomonas paucimobilis* e *Bacillus circulans*. O sequenciamento do 16S rRNA revelou quatro isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter*. A similaridade foi superior a 99% para *Acinetobacter schindleri* no BLAST, agrupado no clado superior

*e-mail: alexcangussu@uft.edu.br

Received: November 22, 2022 – Accepted: February 23, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

a 90%. Várias cepas isoladas de ICU foram resistentes a várias classes de antibióticos. Essas técnicas permitiram a identificação de diversos microrganismos de importância em saúde pública, possibilitando melhorias no controle de infecções humanas e comprovando a qualidade dos insumos, alimentos e água.

Palavras-chave: bactéria multirresistente, ambiente hospitalar, MALDI-TOF MS, 16S rRNA.

1. Introduction

Bacterial infections inside and outside hospital environments are the primary causes of illness. The excessive use of antimicrobial agents in humans and domestic animals has generated high rates of bacterial resistance and has become a severe problem worldwide (Bonelli et al., 2014; Moretto et al., 2021). Community and environmental factors contribute to the emergence of multi-drug resistant bacteria, promoted by the lack of adequate public sanitation and the transmission of domestic effluents to water sources. These phenomena contribute to the spread of pathogens, especially in regions with low human development indexes (Gallini et al., 2010; Bartley et al., 2019; Moretto et al., 2021).

The emergence of new resistance mechanisms may arise in vulnerable communities, leading to the dissemination of bacterial genes via conjugative plasmids (Meirelles-Pereira et al., 2002; Cerceo et al., 2016). Among the primary multi-drug resistant bacteria (MDRs), including species in the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, and enterobacteria that are commonly found in hospital environments, water, soil, and food products (Logan, 2012; Smet et al., 2014; Ferreira et al., 2019; Arbab et al., 2021; Adwan and Omar, 2021). Food is a potential transmission source between the community and clinical settings (Carvalho et al., 2021).

Another critical factor is the ability of bacteria to form a structural community of multiple bacterial cells (biofilm) characterized by high nutritional and metabolic versatility and adherence to living and non-living surfaces. These surfaces include glass, plastic, X-ray equipment, benches, beds, fans, and air circulation systems (Bernards et al., 2004; Gaddy et al., 2009).

Resistance to antibiotics and chemicals (disinfectants) contributes to greater pathogenicity (Gaddy et al., 2009; Nowak and Paluchowska, 2016). β -lactamases act as one of the primary mechanisms associated with resistance; β -lactam resistance is mediated by β -lactamases that inhibit antibiotics, including carbapenems, penicillins, cephalosporins, and monobactams. β -lactamases can be divided into class A (e.g. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, class B metallo- β -lactamases [e.g. New Delhi metallo- β -lactamase, Verona integrin-encoded metallo-beta-lactamases, imipenem-resistant *Pseudomonas*]) and class D β -lactamases (e.g., oxacylinases) (Bush and Jacoby, 2010; Logan, 2012; Lee et al., 2016).

Conventional methods for diagnosing pathogens involve isolating the organism in culture with subsequent analysis of its phenotypic characteristics (i.e., microscopic and macroscopic morphologies) and biochemical evaluations on various substrates (Stepień-Pyśniak et al., 2017). Other methods used in clinical microbiology laboratories include molecular methods with gene sequencing of 16S rRNA and 23S rRNA. MALDI-TOF MS is a rapid and accurate

identification technique for bacteria isolated from biological specimens and can detect various proteins from microbial species (Angeletti, 2017; Tsuchida et al., 2020).

The analysis of microbial diversity in different environments and the multi-drug resistant bacteria profile have essential implications for hospitals stemming from the indiscriminate use of antibiotics. The present work aimed to characterize microbial sources phenotypically in intensive care units (ICUs) and identify isolates using the MALDI-TOF MS and 16S rRNA molecular methods. These techniques are critical for public health because they provide actions to control human infections and benefit the population.

2. Materials and Methods

2.1. Study location; sample processing; ethical and legal permissions.

The Gurupi Regional Hospital – Tocantins – Brazil (11°43'48" S and 49°04'08" W) is located in the Legal Amazon microregion. It is a referral center for 18 municipalities: Aliança do Tocantins, Araguaçu, Alvorada, Cariri do Tocantins, Crixás do Tocantins, Dueré, Figueirópolis, Formoso do Araguaia, Jau do Tocantins, Lagoa da Confusão, Palmeiropolis, Paranã, Peixe, Sandolândia, São Valério, São Salvador, Sucupira, and Talisman. We used samples from beds of patients hospitalized for more than 48 hours. The collection was performed using sterile swabs passed on the bed surface and transported in Cary Blair medium. Samples were cultured on tryptic soy agar (Kasvi, Italy) and incubated aerobically at 37 °C overnight. Bacterial isolates were phenotypically characterized using manual Gram staining methods and measuring motility properties, growth at 44 °C, citrate utilization, oxidase and urease production, and oxidation/fermentation (Castilho et al., 2017). The Research Ethics Committee of the Federal University of Tocantins approved the work (protocol number 72773417.3.0000.5519). After issuing a substantiated opinion of this study, the protocol was forwarded to the Health Department of the State of Tocantins (SESAU/TO) in compliance with ordinance SES-391/2017.

2.2. Phenotypic analysis and resistance classification

We measured antibiotic sensitivity and resistance using the disk diffusion method, following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2017). The isolates were cultured in 100 ml of TSB broth (soy peptone 17 g/l, casein 3 g/l, dextrose 5 g/l, and monobasic potassium phosphate 5 g/l), stirring at 120 rpm at 37 °C for 8 h. Growth was adjusted to 10⁸ colony-forming units/ml and seeded on Mueller-Hinton agar (Kasvi, Italy) between 18 and 24 hours of incubation at 37 °C for recording halo

formation (Castilho et al., 2017). Antibiotics (Sensifar®-Brasil) included ampicillin/sulbactam (20 µg), amikacin (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefepime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), cotrimoxazole (25 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacin (5 µg), linezolid (30 µg), meropenem (10 µg), minocycline (30 µg), norfloxacin (10 µg), piperacillin/tazobactam (110 µg), polymyxin B (330 IU), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Halo inhibition data were measured and ranked, with resistance to ≥ 1 antimicrobial agent in ≥ 3 antimicrobial categories considered MDR. Resistance to ≥ 1 antimicrobial agent in all but two antimicrobial classes was considered extensively drug-resistant (Magiorakos et al., 2012).

2.3. Molecular analysis and detection of genes

The polymerase chain reaction (PCR) was performed using primers for OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58 and the insertion sequence (IS) of the ISAb1 (Sohrabi et al., 2012) (Table 1). DNA extraction was performed using an extraction kit (Invitrogen-PureLink® Genomic DNA Kits). The PCR technique was used to amplify the fragments with a final volume of 20 µL containing 20 ng of DNA, 1.5 mM of MgCl₂, 250 µM dNTP, 1U Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), and 0.47 µM primer. Reactions were carried out in a Thermocycler (Biocycler MJ96G, Applied Biosystems) under the following conditions: denaturation at 95 °C for 4 min; 35 cycles of denaturation (90 °C, 30 seconds), alignment (50 °C, 40 seconds) and extension (72 °C, 1 min); final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide, and visualized using Gel Doc System XR (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.4. Identification of emerging pathogens

2.4.1. DNA extraction and sequencing of the 16S rRNA gene

Bacterial isolates were cultured in brain heart broth (Merck, Germany) and incubated overnight at 37 °C with

continuous shaking at 120 rpm. DNA extraction was performed using an extraction kit (Invitrogen-PureLink® Genomic DNA Kits). PCR of the rDNA16S region amplified the DNA. The sequence of primers 16SF and 16SR amplify a region of 400 bp (16SF-ACTGCTATCCACCCTCAAAC and 16SR CTGGGTGAAGTTGTAATCGG). The PCR product was purified using exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase. The integrity of the genomic DNA was tested by electrophoresis.

The sequencing of the 16S gene was performed on a 3500 sequencer (Thermo Fisher Scientific). Sequencing reactions were set up with 20 ng of DNA, 0.5 µl Big Dye V3.1 (Thermo Fisher Scientific), 2.0 µl of 5X sequencing buffer, and 3.2 µmol of primer. The continuous sequences were compared with reference and outgroup sequences from the National Center for Biotechnology Information using the BLAST system to identify similarities. Phylogenetic analysis of the isolates was performed using the maximum likelihood method and the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) using a MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Branch confidence was tested using 500 bootstrap repetitions.

2.4.2. Identification by MALDI-TOF MS

Isolates were seeded in Brain Heart Infusion (Merck, Germany), incubated at 37 °C for 18 hours, and sent to Instituto Hermes Pardini (Belo Horizonte, Brazil) for microbial identification by automated mass spectrometry equipped with MALDI-TOF MS (BioMérieux, France). Briefly, a fresh colony was spread on a Vitek MS DS target slide, and the preparations were covered with 1 ml of VITEK MS-CHCA matrix solution (a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and trifluoroacetic acid at 2.5%). After drying, the target plate was loaded into the Vitek MS mass spectrometer and air-dried for 1 to 2 minutes at room temperature. Microbial identification was achieved by obtaining spectra using MALDI-TOF and analyzing the spectra using the VITEK MS database. The spectral peaks were compared with the characteristic pattern of a species, genus, or family of microorganisms, resulting in the identification

Table 1. Target genes for PCR amplification, fragment size, and primer sequences.

Beds UTI	No. of bacterial colony	No. bacterial isolate	Fenotypic Characteristic		
			Cell Morphology	Gram positive [%]	Gram negative [%]
1	22	5	Cocci; diplococci; bacilli;	80	20
2	34	5	Cocci; diplococci; bacilli;	100	0
3	10	6	Cocci; diplococci; bacilli;	83.3	16.7
4	89	4	Cocci; diplococci; diplobacilli;	50	50
5	457	8	Cocci; diplococci; bacilli;	62.5	37.5
6	5	4	Cocci; diplococci; bacilli;	60	40
7	23	8	Bacillus; diplococci,	75	25
8	36	11	Cocci; diplococci; bacilli; sarcinas	72	27.2
9	8	5	Cocci; Bacilli	40	60
Total	677	56		80.3	19.6

(Dubois et al., 2012; Moon et al., 2013; Gonçalves et al., 2019). A percentage probability (99.9%) represents the similarity of specific peaks between the generated spectrum and the database spectra. Lower values were designated as inconclusive

3. Results

3.1. Phenotypic characterization, susceptibility testing, and detection of resistance genes

We identified 677 colonies from ICU bed surfaces; 56 bacterial isolates were obtained for characterization (8.2%; n = 677) (Table 2). Of these, 80.3% were gram-positive (n = 45) and 19.6% were gram-negative (n = 11) (Table 2). Sensitivity analysis revealed a resistance rate for cotrimoxazole of 44%, ceftazidime of 32%, ciprofloxacin of 28%, norfloxacin of 25%, and cefepime of 23%. The lowest resistance rate was obtained for minocycline and amikacin (1.7%) (Figure 1). Five isolates (ILH10, ILH14, ILH13, ILH16, and ILH2) were resistant to an antibiotic of various classes (penicillins, cephalosporins, quinolones, polymyxins, tetracycline, and sulfonamides) (Table 3). Another isolate (ILH11) showed resistance only to β -lactam class antibiotics (penicillin, cephalosporins, and carbapenems). There was no evidence for the presence of resistance genes related to *bla*_{OXA-51'}, *bla*_{OXA-40'}, *bla*_{OXA-58'} or the ISAb1 element. By contrast, we identified *bla*_{OXA-23} genes in the ILH10 isolate. There was no evidence of *bla*_{OXA-23'}, *bla*_{OXA-51'}, *bla*_{OXA-40'}, *bla*_{OXA-58'} or ISAb1 in the isolates ILH11, ILH13, ILH14, ILH16, and ILH2; however, these isolates were resistant to at least one penicillin, cephalosporin, or quinolone (Tables 3 and 4).

3.2. Bacterial identification using 16S rRNA and MALDI-TOF MS

The isolates ILH10, ILH11, ILH13, and ILH2 were identified only in the sequencing of the 16S rRNA gene and belonged to the genera *Acinetobacter* and *Bacillus* (Table 3). The ILH10 isolate was subjected to phylogenetic analysis involving 19 nucleotide sequences from the

genus *Acinetobacter* (Figure 2). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences (pair deletion option). There were 1593 positions in the final dataset of the ILH10 isolate that showed more significant similarity with 99.3% to *Acinetobacter schindleri* in BLAST, grouping 90% in the clade with bootstrap higher than 90% (Table 3; Figure 2). The ILH13 isolate was subjected to phylogenetic analysis involving 18 nucleotide sequences from the genus *Bacillus* (Figure 2). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences (pair deletion option). There were 1555 positions in the final dataset of the ILH13 isolate that showed more significant similarity with 100% to *Bacillus cereus* in BLAST, in the clade with bootstrap higher than 90% (Table 3; Figure 2). The ILH2 isolate was subjected to phylogenetic analysis involving 22 nucleotide sequences from the genus *Bacillus* (Figure 2). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences (pair deletion option). There were 1561 positions in the final dataset of the ILH2 isolate that showed more significant similarity with 99.7% to *Bacillus Licheniformis* in BLAST, in the clade with bootstrap higher than 80% (Table 3; Figure 2). Only

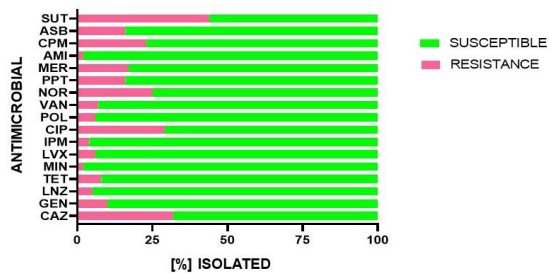


Figure 1. Antimicrobial rates of bacterial resistance isolated from ICU hospital bed surfaces (n = 56). Antibiotics: ceftazidime (CAZ), gentamicin (GEN), linezolid (LNZ), tetracycline (TET), minocycline (MIN), levofloxacin (LVX), imipenem (IPM), ciprofloxacin (CIP), polymyxin B (POL), vancomycin (VAN), norfloxacin (NOR), piperacillin/tazobactam (PPT), meropenem (MER), amikacin (AMI), cefepime (CPM), ampicillin/sulbactam (ASB), cotrimoxazole (sulfatrin) (SUT), imipenem (IPM)

Table 2. Phenotypic characterization of isolates from hospital ICU beds in Tocantins, Brazil.

Group	Gene	Primer sequence (5'-3')	Temperature melting (°C)	Expected Aplicon size (pb)	Reference
β -Lactamases (Class D)	<i>Oxa-23F</i>	GATGTGTCATAGTATTTCGTCGT	50	1,057	Sohrabi et al. (2012)
	<i>Oxa-23R</i>	TCACAACAACATAAAGCACTGT			
	<i>Oxa-51F</i>	AACAAGCGCTATTTTATTTCAG	50	641	
	<i>Oxa-51R</i>	CCCATCCCCAACCACTTTT			
	<i>Oxa-40F</i>	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	50	825	
	<i>Oxa-40R</i>	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC			
	<i>Oxa-58F</i>	AGTATTGGGGCTGTGCT	49	453	
	<i>Oxa-58R</i>	AACCTCCGTCGCTATTTG			
IS element	<i>ISAb1F</i>	CATTGGCATTAACTGAGGAGAAA	50	451	Sohrabi et al. (2012)
	<i>ISAb1R</i>	TTGGAAATGGGGAAACGAA			

Table 3. Antimicrobial resistance of isolates and 16S rRNA gene sequencing.

Isolate Beds UTI (Codes)*	Scientific Name	Number GenBank accession	Query cover (%)	Identity (%)	N. accession GenBank 16S rRNA gene partial sequence	Antimicrobial resistance	Genes					MDR**
							<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-40}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ISAbal</i>	
ILH10	<i>A. schindleri</i>	NR_025412.1	100	99.3	ON853562.1	caz, cpm, lvx, cip, asb, ppt, pol tet, sut,	P	N	N	N	N	P
ILH11	<i>B. subtilis</i>	NR_102783.2	98	97.4	ON853563.1	caz, cpm, asb, ppt, mer	N	N	N	N	N	N
ILH13	<i>B. cereus</i>	NR_115526.1	100	100	ON853564.1	caz, cpm, nor, lvx, cip asb, pol	N	N	N	N	N	P
ILH2	<i>B. licheniformis</i>	NR_118996.1	98	99.7	ON853570.1	cip, asb, ppt, gen, tet lnz,	N	N	N	N	N	P

Antibiotics: ceftazidime (caz), cefepime (cpm), norfloxacin (nor), levofloxacin (lvx), ciprofloxacin (cip), ampicillin/sulbactam (asb), piperacillin/tazobactam (ppt), meropenem (mer), gentamicin (gen), polymyxin B (pol), tetracycline (tet), linezolid (lnz), cotrimoxazole (sulfatrin) (sut). P: Positive; N: Negative. *ILH - Isolated Hospital Beds. **Multidrug resistant bacteria.

Table 4. Antimicrobial resistance of isolates and microbial identification by MALDI-TOF MS.

Isolate Beds UTI (Codes)*	MALDI-TOF MS	Antimicrobial resistance	Genes					MDR**
			<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-40}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ISAbal</i>	
ILH14	<i>S. paucimobilis</i>	cip, ppt, asb, gen, pol, tet lnz,	N	N	N	N	N	P
ILH16	<i>B. circulans</i>	caz cpm, nor, lvx, cip ppt, asb, lpm	N	N	N	N	N	P

Antibiotics: ceftazidime (caz), cefepime (cpm), norfloxacin (nor), levofloxacin (lvx), ciprofloxacin (cip), ampicillin/sulbactam (asb), piperacillin/tazobactam (ppt), imipenem (ipm), gentamicin (gen), polymyxin B (pol), tetracycline (tet), linezolid (lnz). P: Positive; N: Negative. *ILH - Isolated Hospital Beds. ** Multidrug resistant bacteria.

ILH14 and ILH 16 were identified using MALDI-TOF MS, revealing *Sphingomonas paucimobilis* and *Bacillus circulans* (Table 4; Figure 3). ILH10, ILH11, ILH13, and ILH2 were not detected using the technique because the system did not include a reference database for identification (Table 4).

4. Discussion

The indiscriminate use of antibiotics inevitably leads to antimicrobial resistance, primarily through natural resistance and antibiotic residues in sewage and soils (Moretto et al., 2021). The Gurupi Regional Hospital, the study site, is a referral center for 18 municipalities in the state of Tocantins, which can favor the dissemination of MDRs via dissemination between communities and environments through domestic effluents and food (Meirelles-Pereira et al., 2002; Cerceo et al., 2016). This factor explains the presence of bacteria in the genera *Bacillus*, *Acinetobacter* and *Sphingomonas*, found in Gurupi Regional Hospital, also commonly found in water, soil, and food products (Logan 2012; Smet et al., 2014; Ferreira et al., 2019; Arbab et al., 2021; Carvalheira et al., 2021). Infections caused by nosocomial pathogens lead to morbidity and mortality in hospitalized patients with the emergence of MDR bacteria (Weber et al., 2010; Otter et al., 2013; Dancer, 2014; Sood and Perl, 2016). Reports have

shown that biofilm formation is favorable to the growth of persistent colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Clostridium difficile*, and *Pseudomonas aeruginosa* (Kramer et al., 2006; Boyce, 2007; Chemaly et al., 2014; Hu et al., 2015). Here, we verified the phenotypic and genotypic characterization of ICU bed surface isolates, showing the presence of MDR bacteria, description of resistance genes, and identification by MALDI-TOF MS and 16S rRNA sequencing. Limitations regarding the database of protein profiles of isolates make it challenging to use MALDI-TOF MS to identify unconventional bacterial strains of medical interest. Studies have described the failure to identify strains due to the absence of a broad protein spectrum from a reference bank or even the capture of the technique of specific proteins necessary to define the species. (Bizzini et al., 2011; Alizadeh et al., 2021). However, data on its applicability reveal MALDI-TOF MS's importance in quickly typing subspecies of medical importance; the technique contributes to the proper management of antimicrobials and best hospital practices. On the other hand, its limitations highlight the need to increase reference data for reference banks (Croxatto et al., 2012; Angeletti, 2017; Davies et al., 2021). 16S rRNA gene sequencing allowed greater coverage and effectiveness in identifying microorganisms.

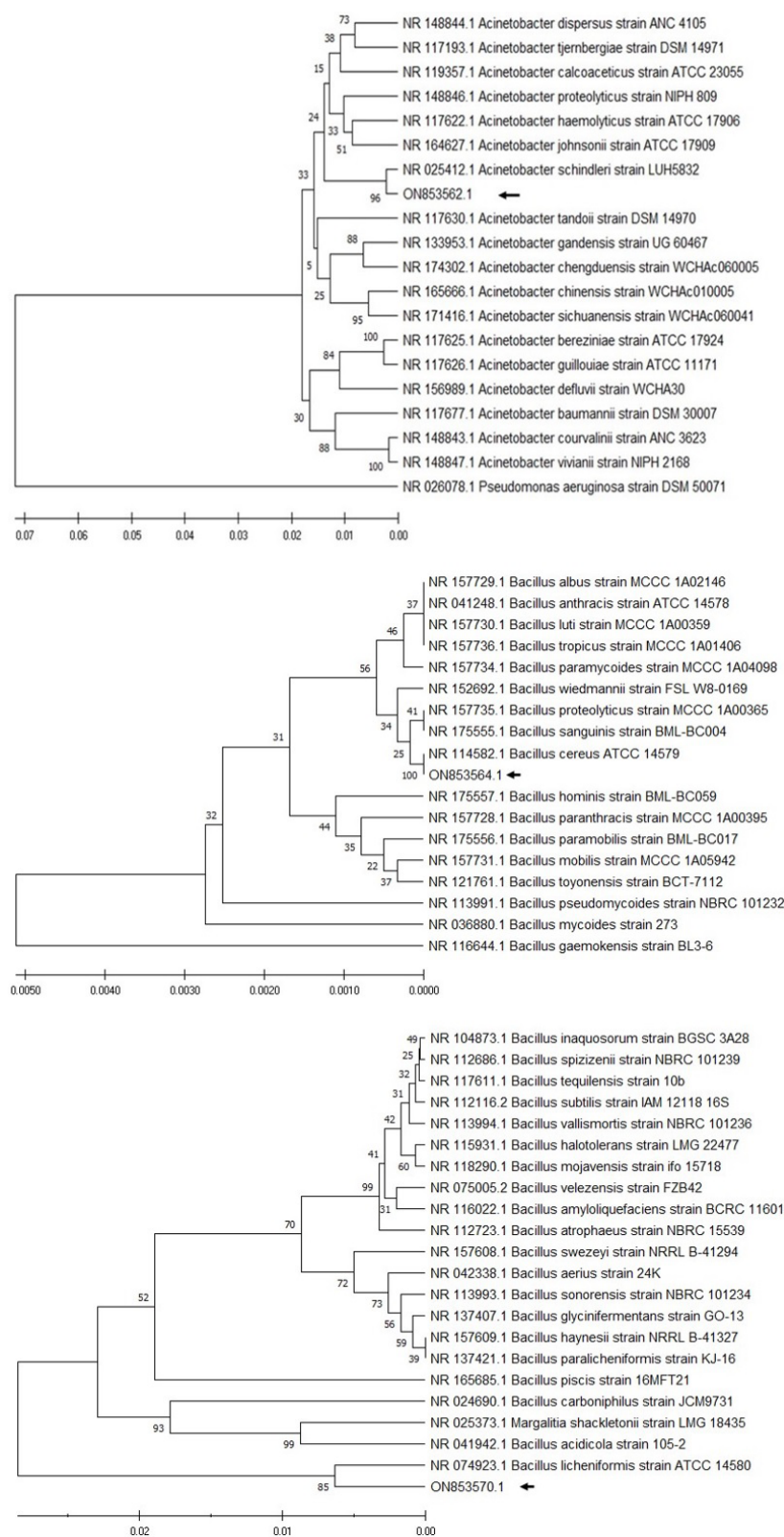


Figure 2. Phylogenetic tree obtained by maximum likelihood of the 16S rRNA gene sequences (400 bp) of the ILH10 isolate with identification of deposit in GenBank ON853562.1 (black arrow). ILH13 isolate with identification of deposit in GenBank ON853564.1 (black arrow). ILH2 isolate with identification of deposit in GenBank ON853570.1 (black arrow). Bootstrap values are indicated at the root of each branch.

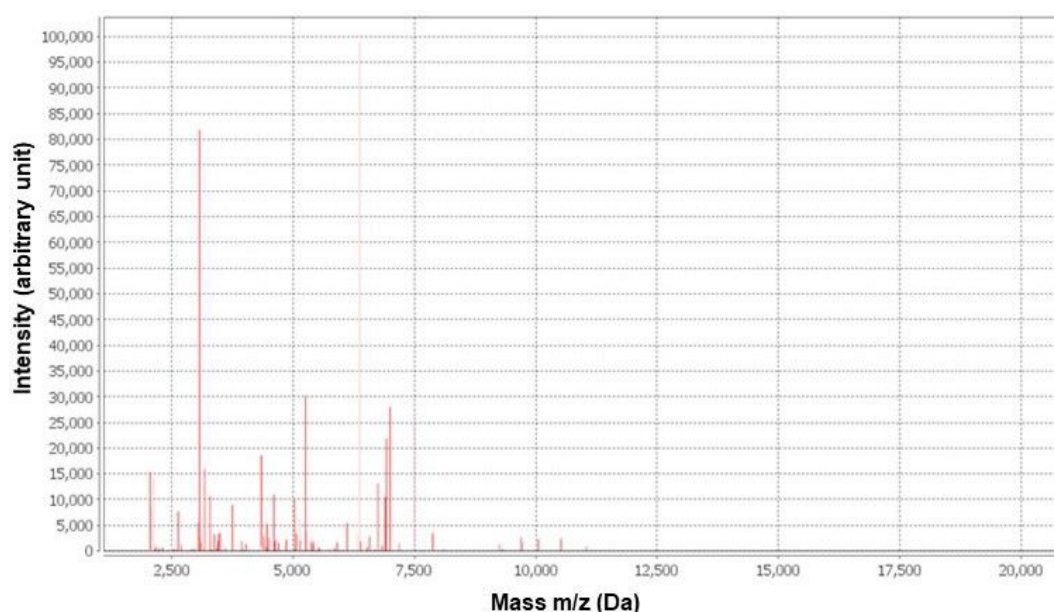


Figure 3. Mass spectrometer with the proteomic profile of isolate ILH16 (*B. circulans*) by MALDI-TOF MS.

The technique is used widely for the identification of most bacterial taxa. However, the technique entails substantial performance time and high processing costs (Clarridge III, 2004; Bizzini et al., 2011; Church et al., 2020; Kosecka-Strojek et al., 2019). Our work using the 16S rRNA technique effectively identified the bacterial isolates classified by similarity and construction of the phylogenetic profile.

For ILH-10 (*A. schindleri*), we observed phenotypes resistant to several antibiotics in different classes. The isolate was positive for OXA-23, which may be associated with a multi-resistance phenotype to beta-lactams. *Acinetobacter* are opportunistic pathogens, and most are clinically significant, typically causing severe nosocomial infections in immunocompromised hosts (Joly-Guillou, 2005; Ibrahim et al., 2021). *Acinetobacter* is often associated with the accumulation of different resistance mechanisms to commercially available antibiotics, including carbapenems (Fournier et al., 2006; Périchon et al., 2014; Zander et al., 2014). Species producing class D β -lactamases of the oxa gene type (e.g., *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. pittii*, *A. baylyi*, and *A. schindleri*) have been reported worldwide (Boo et al., 2009; Zhou et al., 2011; Zander et al., 2014; Smet et al., 2014). Furthermore, it is essential to note that resistance genes in non-*A. baumannii* (*A. schindleri*) species can cause bacteremia due to carbapenem resistance in immunocompromised patients (Montaña et al., 2017).

S. paucimobilis (ILH14) is an opportunistic pathogen involved in nosocomial infections; it can cause significant problems in clinical settings when resistant to antibiotics. Reports described *S. paucimobilis* in clinical specimens, blood, urine, endotracheal aspirates, bronchoalveolar lavage, and cerebrospinal fluid of patients with septicemia, meningitis, lower respiratory tract infections, and ventilator-associated pneumonia (Rohilla et al., 2021). Cases

of early prosthetic valve infective endocarditis caused by MDR *S. paucimobilis* have been reported (Saboe et al., 2021). The *S. paucimobilis* (ILH14) isolated here was identified using the MALDI-TOF MS technique with phenotyping of MDR antibiotics the quinolone, penicillin, aminoglycoside, polymyxin, tetracycline, and oxazolidinone classes.

Bacillus sp. isolates (ILH11, ILH13, ILH2, and ILH16) showed resistance to clinically relevant antibiotics such as cephalosporins, quinolones, and penicillins. This genus is widely distributed in the environment, including soil, dust, air, fomites, water, and hospital environments (Bottone, 2010). The broad diversity of *Bacillus* allows gene regulation that increases its pathogenicity (Bottone, 2010). Previous studies identified MDR phenotypes in this group (Torkar and Bedenic, 2018; Liu et al., 2018; Mills et al., 2022). Some MDR strains of *Bacillus* sp obtained in the present study cause food poisoning. They can also cause localized wounds and eye infections; in a hospital environment, they can cause nosocomial bacteremia (Kuroki et al., 2009; Ehling-Schulz et al., 2019) and meningitis in immunocompromised patients (Gaur et al., 2001). Opportunistic infections by *Bacillus circulans* were identified in immunocompromised patients (Russo et al., 2021).

In summary, our findings suggest that several strains obtained from ICUs showed resistance to several classes of antimicrobials identified by molecular techniques and MALDI-TOF MS; however, the latter technique may be more relevant when associated with antimicrobial resistance phenotyping to assist antimicrobial management. Our findings reinforce the need to investigate resistance genes of the β -lactamase class. Finally, our findings suggest the need for amplification in detecting specific resistance genes. Our findings also contribute to identifying contamination sources responsible for increasing MDR

organism levels. Monitoring these sources will improve environmental, food, and public health infection controls.

Acknowledgements

The authors would like to thank National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) Project: CNPq 315095/2018-0 and CNPq 305589/2021-0, Tocantins State Foundation for Research (FAPT project PPSUS837598/2016), Biodiversity and Biotechnology Graduate Program and the Vice-Rector of Research from the Federal University of Tocantins.

References

- ADWAN, G. and OMAR, G., 2021. Phenotypic and molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Palestine. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 82, pp. e239868. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.239868>. PMID:34190800.
- ALIZADEH, M., YOUSEFI, L., PAKDEL, F., GHOTASLOU, R., REZAEI, M.A., KHODADADI, E. and KAFIL, H.S., 2021. MALDI-TOF mass spectroscopy applications in clinical microbiology. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2021, pp. 9928238. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/9928238>. PMID:34041492.
- ANGELETTI, S., 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 138, pp. 20-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>. PMID:27613479.
- ARBAB, S., ULLAH, H., WEI, X., WANG, W., AHMAD, S.U. and ZHANG, J., 2021. Drug resistance and susceptibility testing of Gram negative bacterial isolates from healthy cattle with different β -Lactam resistance Phenotypes from Shandong province China. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 83, pp. e247061. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.247061>. PMID:34468524.
- BARTLEY, P.S., DOMITROVIC, T.N., MORETTO, V.T., SANTOS, C.S., PONCE-TERASHIMA, R., REIS, M.G., BARBOSA, L.M., BLANTON, R.E., BONOMO, R.A. and PEREZ, F., 2019. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 100, no. 6, pp. 1369-1377. PMID:30994094.
- BERNARDS, A.T., HARINCK, H.I.J., DIJKSHOORN, L., VAN DER REIJDEN, T.J.K. and VAN DEN BROEK, P.J., 2004. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. 25, no. 11, pp. 1002-1004. <http://dx.doi.org/10.1086/502335>. PMID:15566039.
- BIZZINI, A., JATON, K., ROMO, D., BILLE, J., PROD'HOM, G. and GREUB, G., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, no. 2, pp. 693-696. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01463-10>. PMID:21106794.
- BONELLI, R.R., MOREIRA, B.M. and PICÃO, R.C., 2014. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, vol. 17, no. 1-2, pp. 24-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>. PMID:24618111.
- BOO, T.W., WALSH, F. and CROWLEY, B., 2009. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter genomic species 3*. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 58, no. 2, pp. 209-216. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.004911-0>. PMID:19141738.
- BOTTONE, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 382-398. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00073-09>. PMID:20375358.
- BOYCE, J.M., 2007. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *The Journal of Hospital Infection*, vol. 65, no. 2, suppl. 2, pp. 50-54. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60015-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60015-2). PMID:17540242.
- BUSH, K. and JACOBY, G.A., 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 3, pp. 969-976. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01009-09>. PMID:19995920.
- CARVALHEIRA, A., SILVA, J. and TEIXEIRA, P., 2021. *Acinetobacter spp.* in food and drinking water—a review. *Food Microbiology*, vol. 95, pp. 103675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2020.103675>. PMID:33397609.
- CASTILHO, S.R.A., GODOY, C.S.D.M., GUILARDE, A.O., CARDOSO, J.L., ANDRÉ, M.C.P., JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. and KIPNIS, A., 2017. Strains isolated from patients in intensive care units in Goiania, Brazil: molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS One*, vol. 12, no. 5, pp. e0176790. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>. PMID:28475585.
- CERCEO, E., DEITELZWEIG, S.B., SHERMAN, B.M. and AMIN, A.N., 2016. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, vol. 22, no. 5, pp. 412-431. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2015.0220>. PMID:26866778.
- CHEMALY, R.F., SIMMONS, S., DALE JUNIOR, C., GHANTOJI, S.S., RODRIGUEZ, M., GUBB, J., STACHOWIAK, J. and STIBICH, M., 2014. The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, vol. 2, no. 3-4, pp. 79-90. <http://dx.doi.org/10.1177/2049936114543287>. PMID:25469234.
- CHURCH, D.L., CERUTTI, L., GÜRTLER, A., GRIENER, T., ZELAZNY, A. and EMLER, S., 2020. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 4, pp. e00053-e19. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00053-19>. PMID:32907806.
- CLARRIDGE III, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 4, pp. 840-862. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>. PMID:15489351.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI, 2017. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (Supplement M100)*. 27th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CROXATTO, A., PROD'HOM, G. and GREUB, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 380-407. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>. PMID:22092265.
- DANCER, S.J., 2014. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 4, pp. 665-690. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00020-14>. PMID:25278571.

- DAVIES, Y.M., FRANCO, L.S., BARBOSA, F.B., VANIN, C.L., GOMES, V.T.D.M., MORENO, L.Z., BARBOSA, M.R.F., SATO, M.I.Z., MORENO, A.M. and KNÖBL, T., 2021. Use of MALDI-TOF for identification and surveillance of gram-negative bacteria in captive wild psittacines. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 82, pp. e233523. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.233523>. PMID:33787713.
- DUBOIS, D., GRARE, M., PRERE, M.F., SEGONDS, C., MARTY, N. and OSWALD, E., 2012. Performances of the MALDI-TOF mass spectrometry system VITEK MS for the rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 8, pp. 2568-2576. PMID:22593596.
- EHLING-SCHULZ, M., LERECLUS, D. and KOEHLER, T.M., 2019. The *Bacillus cereus* group: bacillus species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, vol. 7, no. 3, pp. 7-3. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>. PMID:3111815.
- FERREIRA, R.L., DA SILVA, B.C.M., REZENDE, G.S., NAKAMURA-SILVA, R., PITONDO-SILVA, A., CAMPANINI, E.B., BRITO, M.C.A., DA SILVA, E.M.L., FREIRE, C.C.M., CUNHA, A.F. and PRANCHEVICIUS, M.-C.S., 2019. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, pp. 3198. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.03198>. PMID:30723463.
- FOURNIER, P.E., RICHET, H. and WEINSTEIN, R.A., 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, no. 5, pp. 692-699. <http://dx.doi.org/10.1086/500202>. PMID:16447117.
- GADDY, J.A., TOMARAS, A.P. and ACTIS, L.A., 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, vol. 77, no. 8, pp. 3150-3160. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00096-09>. PMID:19470746.
- GALLINI, A., DEGRIS, E., DESPLAS, M., BOURREL, R., ARCHAMBAUD, M., MONTASTRUC, J.L., LAPEYRE-MESTRE, M. and SOMMET, A., 2010. Influence of fluoroquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a university hospital. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, no. 12, pp. 2650-2657. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq351>. PMID:20876240.
- GAUR, A.H., PATRICK, C.C., MCCULLERS, J.A., FLYNN, P.M., PEARSON, T.A., RAZZOUK, B.I., THOMPSON, S.J. and SHENEP, J.L., 2001. *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, no. 10, pp. 1456-1462. <http://dx.doi.org/10.1086/320154>. PMID:11317247.
- GONÇALVES, G.G.A., FEITOSA, A.P.S., PORTELA-JUNIOR, N.C., OLIVEIRA, C.M.F., LIMA FILHO, J.L., BRAYNER, F.A. and ALVES, L.C., 2019. Use of MALDI-TOF MS to identify the culturable midgut microbiota of laboratory and wild mosquitoes. *Acta Tropica*, vol. 200, pp. 105174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105174>. PMID:31525322.
- HU, H., JOHANI, K., GOSBELL, I.B., JACOMBS, A.S., ALMATROUDI, A., WHITELEY, G.S., DEVA, A.K., JENSEN, S. and VICKERY, K., 2015. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *The Journal of Hospital Infection*, vol. 91, no. 1, pp. 35-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.05.016>. PMID:26187533.
- IBRAHIM, S., AL-SARYI, N., AL-KADMY, I. and AZIZ, S.N., 2021. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*, vol. 48, no. 10, pp. 6987-6998. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>. PMID:34460060.
- JOLY-GUILLOU, M.L., 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, no. 11, pp. 868-873. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x>. PMID:16216100.
- KOSECKA-STROJEK, M., SABAT, A.J., AKKERBOOM, V., KOOISTRA-SMID, A., MIEDZOBRODZKI, J. and FRIEDRICH, A.W., 2019. Development of a reference data set for assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* species based on next generation sequencing of the 16S-23S rRNA region. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, vol. 8, no. 1, pp. 178. <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-019-0622-3>. PMID:31788235.
- KRAMER, A., SCHWEBKE, I. and KAMPF, G., 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 130. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>. PMID:16914034.
- KUROKI, R., KAWAKAMI, K., QIN, L., KAJI, C., WATANABE, K., KIMURA, Y., ISHIGURO, C., TANIMURA, S., TSUCHIYA, Y., HAMAGUCHI, I., SAKAKURA, M., SAKABE, S., TSUJI, K., INOUE, M. and WATANABE, H., 2009. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, vol. 48, no. 10, pp. 791-796. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.48.1885>. PMID:19443973.
- LEE, C.R., LEE, J.H., PARK, K.S., KIM, Y.B., JEONG, B.C. and LEE, S.H., 2016. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp. 895. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>. PMID:27379038.
- LIU, T., ZHU, L., ZHANG, Z., JIANG, L. and HUANG, H., 2018. Draft genome sequence of *Bacillus* sp. M13 (2017), a multidrug-resistant subclass B1 blaNDM-producing, spore-forming bacterium isolated from China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 14, pp. 152-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.07.002>. PMID:30017730.
- LOGAN, L.K., 2012. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: an emerging problem in children. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 55, no. 6, pp. 852-859. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis543>. PMID:22700827.
- MAGIORAKOS, A.-P., SRINIVASAN, A., CAREY, R.B., CARMELI, Y., FALAGAS, M.E., GISKE, C.G., HARBARTH, S., HINDLER, J.F., KAHLMEIER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D.L., RICE, L.B., STELLING, J., STRUELENS, M.J., VATOPOULOS, A., WEBER, J.T. and MONNET, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 3, pp. 268-281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>. PMID:21793988.
- MEIRELLES-PEREIRA, F., PEREIRA, A.M.S., SILVA, M.C.G., GONÇALVES, V.D., BRUM, P.R., CASTRO, A.R., PEREIRA, A.A., ESTEVES, F.A. and PEREIRA, J.A.A., 2002. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 33, no. 4. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400002>.
- MILLS, E., SULLIVAN, E. and KOVAC, J., 2022. Comparative analysis of *Bacillus cereus* group isolates' resistance using disk diffusion and broth microdilution and the correlation between antimicrobial resistance phenotypes and genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 88, no. 6, pp. e0230221. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02302-21>. PMID:35225691.
- MONTAÑA, S., PALOMBARANI, S., CARULLA, M., KUNST, A., RODRIGUEZ, C.H., NASTRO, M., VAY, C., RAMIREZ, M.S.

- and ALMUZARA, M., 2017. First case of bacteraemia due to *Acinetobacter schindleri* harbouring blaNDM-1 in an immunocompromised patient. *New Microbes and New Infections*, vol. 21, pp. 28–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.004>. PMID:29201380.
- MOON, H.W., LEE, S.H., CHUNG, H.S., LEE, M. and LEE, K., 2013. Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 62, no. 9, pp. 1301–1306. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.062950-0>. PMID:23764744.
- MORETTO, V.T., BARTLEY, P.S., FERREIRA, V.M., SANTOS, C.S., SILVA, L.K., PONCE-TERASHIMA, R.A., BLANTON, R.E., REIS, M.G. and BARBOSA, L.M., 2021. Microbial source tracking and antimicrobial resistance in one river system of a rural community in Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 82, pp. e231838. PMID:33681894.
- NOWAK, P. and PALUCHOWSKA, P., 2016. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol. 54, no. 2, pp. 61–74. PMID:27270503.
- OTTER, J.A., YEZLI, S., SALKELD, J.A. and FRENCH, G.L., 2013. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American Journal of Infection Control*, vol. 41, no. 5, (suppl.), pp. S6–S11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.004>. PMID:23622751.
- PÉRICHON, B., GOUSSARD, S., WALEWSKI, V., KRIZOVA, L., CERQUEIRA, G., MURPHY, C., FELDGARDEN, M., WORTMAN, J., CLERMONT, D., NEMEC, A. and COURVALIN, P., 2014. Identification of 50 class D β -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, no. 2, pp. 936–949. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01261-13>. PMID:24277043.
- ROHILLA, R., RAINA, D., SINGH, M., PANDITA, A.K. and PATWAL, S., 2021. Evaluation of *Sphingomonas paucimobilis* as an emerging nosocomial pathogen in a teaching hospital in Uttarakhand. *Iranian Journal of Microbiology*, vol. 13, no. 5, pp. 617–623. <http://dx.doi.org/10.18502/ijm.v13i5.7425>. PMID:34900159.
- RUSSO, A., TARANTINO, U., D'ETTORRE, G., DELLA ROCCA, C., CECCARELLI, G., GASBARRA, E., VENDITTI, M. and IUNDUSI, R., 2021. First report of spondylodiscitis caused by *Bacillus circulans* in an immunocompetent patient: clinical case and review of the literature. *IDCases*, vol. 23, pp. e01058. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01058>. PMID:33552902.
- SABOE, A., ADRIAN, Y., WIDYATMOKO, L., HASAN, M., COOL, C.J., HARTANTRI, Y. and RAHMADI, R.A., 2021. A fatal case of early prosthetic valve endocarditis caused by multidrug-resistant (MDR)-*Sphingomonas paucimobilis*. *IDCases*, vol. 24, pp. e01152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01152>. PMID:34026540.
- SMET, A., COOLS, P., KRIZOVA, L., MAIXNEROVA, M., SEDO, O., HAESBROUCK, F., KEMPF, M., NEMEC, A. and VANECHOUTTE, M., 2014. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 64, no. 12, pp. 4007–4015. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.068791-0>. PMID:25225259.
- SOHRABI, N., FARAJNIA, S., AKHI, M.T., NAHAEL, M.R., NAGHILI, B., PEYMANI, A., AMIRI, Z., REZAEE, M.A. and SAEED, I.N., 2012. Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, vol. 18, no. 4, pp. 385–389. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2011.0077>. PMID:22352411.
- SOOD, G. and PERL, T., 2016. Outbreaks in health care settings. *Infectious Disease Clinics*, vol. 30, no. 3, pp. 661–687. PMID:27515142.
- STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D., HAUSCHILD, T., RÓŻAŃSKI, P. and MAREK, A., 2017. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus* spp. from wild birds and differentiation of closely related species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 6, pp. 1128–1137. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1612.12036>. PMID:28285496.
- TAMURA, K. and NEI, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, no. 3, pp. 512–526. PMID:8336541.
- TAMURA, K., STECHER, G. and KUMAR, S., 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>. PMID:33892491.
- TORKAR, K.G. and BEDENIĆ, B., 2018. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates. *Microbial Pathogenesis*, vol. 118, pp. 140–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.026>. PMID:29551437.
- TSUCHIDA, S., UMEMURA, H. and NAKAYAMA, T., 2020. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 25, no. 20, pp. 4775. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204775>. PMID:33080897.
- WEBER, D.J., RUTALA, W.A., MILLER, M.B., HUSLAGE, K. and SICKBERT-BENNETT, E., 2010. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, vol. 38, no. 5, suppl. 1, pp. S25–S33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.04.196>. PMID:20569853.
- ZANDER, E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A., SCHLEICHER, X., DAMMHAYN, C., KAMOLVIT, W., SEIFERT, H. and HIGGINS, P.G., 2014. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 43, no. 4, pp. 375–377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012>. PMID:24612983.
- ZHOU, Z., DU, X., WANG, L., YANG, Q., FU, Y. and YU, Y., 2011. Clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baylyi* strain coharboring bla SIM-1 and bla OXA-23 from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 11, pp. 5347–5349. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00425-11>. PMID:21876057.

Article

Using an Aluminum Hydroxide–Chitosan Matrix Increased the Vaccine Potential and Immune Response of Mice against Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Túllio T. Deusdará ¹, Mellanie K. C. Félix ¹, Helio de S. Brito ¹, Edson W. S. Cangussu ², Wellington de S. Moura ¹, Benedito Albuquerque ², Marcos G. Silva ², Gil R. dos Santos ^{1,2}, Paula B. de Moraes ¹, Elizangela F. da Silva ³, Yury O. Chaves ³, Luis Andre M. Mariúba ³, Paulo A. Nogueira ³, Spartaco Astolfi-Filho ⁴, Enedina N. Assunção ⁴, Sabrina Epiphanyo ⁵, Claudio R. F. Marinho ⁵, Igor V. Brandi ^{6,7}, Kelvinson F. Viana ⁸, Eugenio E. Oliveira ^{2,9} and Alex Sander R. Cangussu ^{1,2,*}

¹ Graduate Program for Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazon, Federal University of Tocantins, Palmas 77001-090, TO, Brazil

² Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Tocantins, Gurupi 77425-000, TO, Brazil

³ Instituto Leônidas e Maria Deane, Oswaldo Cruz Foundation-Fiocruz Amazônia, Manaus 69057-070, AM, Brazil

⁴ Laboratory of DNA Technology, Biotechnology Department, Multidisciplinary Support Center, Federal University of Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil

⁵ Department of Immunology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-060, SP, Brazil

⁶ Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Minas Gerais, Montes Claros 39400-310, MG, Brazil

⁷ Department of Biology, State University of Montes Claros, Montes Claros 39401-089, MG, Brazil

⁸ Interdisciplinary Center for Life Sciences and Nature, Federal University of Latin American Integration (UNILA), Foz do Iguaçu 85866-000, PR, Brazil

⁹ Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil

* Correspondence: alexcangussu@uft.edu.br



Citation: Deusdará, T.T.; Félix, M.K.C.; de S. Brito, H.; Cangussu, E.W.S.; de S. Moura, W.; Albuquerque, B.; Silva, M.G.; dos Santos, G.R.; de Moraes, P.B.; da Silva, E.F.; et al. Using an Aluminum Hydroxide–Chitosan Matrix Increased the Vaccine Potential and Immune Response of Mice against Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Vaccines* **2023**, *11*, 669. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030669>

Academic Editor: Eduardo Gomez-Casado

Received: 8 February 2023

Revised: 2 March 2023

Accepted: 6 March 2023

Published: 16 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Acinetobacter baumannii* is a Gram-negative, immobile, aerobic nosocomial opportunistic coccobacillus that causes pneumonia, septicemia, and urinary tract infections in immunosuppressed patients. There are no commercially available alternative antimicrobials, and multi-drug resistance is an urgent concern that requires emergency measures and new therapeutic strategies. This study evaluated a multi-drug-resistant *A. baumannii* whole-cell vaccine, inactivated and adsorbed on an aluminum hydroxide–chitosan (mAhC) matrix, in an *A. baumannii* sepsis model in immunosuppressed mice by cyclophosphamide (CY). CY-treated mice were divided into immunized, non-immunized, and adjuvant-inoculated groups. Three vaccine doses were given at 0D, 14D, and 28D, followed by a lethal dose of 4.0×10^8 CFU/mL of *A. baumannii*. Immunized CY-treated mice underwent a significant humoral response, with the highest IgG levels and a higher survival rate (85%); this differed from the non-immunized CY-treated mice, none of whom survived ($p < 0.001$), and from the adjuvant group, with 45% survival ($p < 0.05$). Histological data revealed the evident expansion of white spleen pulp from immunized CY-treated mice, whereas, in non-immunized and adjuvanted CY-treated mice, there was more significant organ tissue damage. Our results confirmed the proof-of-concept of the immune response and vaccine protection in a sepsis model in CY-treated mice, contributing to the advancement of new alternatives for protection against *A. baumannii* infections.

Keywords: multi-drug-resistant; *Acinetobacter baumannii*; immunosuppression model; inactivated whole-cell vaccine

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic Gram-negative, immobile, aerobic coccobacillus that causes pneumonia, septicemia, urinary tract infections, and meningitis,

especially in immunocompromised patients who are hospitalized for long periods or who undergo invasive procedures with the prior use of antimicrobials [1–5]. *A. baumannii* is an emerging multi-drug organism that exists as resistant (i.e., resistant to three or more classes of antimicrobials), extensively drug-resistant (i.e., resistant to all classes of antimicrobials but one or two), or pan-drug-resistant (i.e., resistant to all existing antimicrobial classes) [6,7]. Multi-drug resistance is a multifactorial process; it occurs through the production of the chromosomal AmpC beta-lactamase enzyme and intrinsic oxacillinase, the loss of porin expression, the overexpression of active expulsion systems, changes in outer membrane permeability, antimicrobial efflux, and changes in drug binding sites [8,9]. It resists carbapenems by acquiring genes encoding β -lactamase, belonging to the bla OXA-gene cluster 23, which includes OXA-27, OXA-49, and OXA-73; this alteration gives rise to drug permeability and mechanisms that modulate antibiotic affinity [7,10–12].

Murine models of sepsis and pneumonia caused by *A. baumannii* are thought to contribute to the understanding of the pathogenesis and the dynamics of the host response because these animals develop acute infections with pathological changes; they can therefore be used for the elaboration of new infection protocols and vaccine quality control and for the development of pharmacological interventions [13–20].

Most infection models use cyclophosphamide (CY) or virulence enhancement of *A. baumannii* (by mucin) that causes infections similar to those found in patients [21]. CY is the immunosuppressive drug most widely used in murine models to understand disease mechanisms and immune responses [21–23]. It is an immunosuppressive alkylating agent that causes a reduction in polymorphonuclear neutrophils; it predisposes the host to severe infections [24], inactivating the rapid cycle of the immune cell population, causing granulopenia [23,25,26] and decreasing B lymphocytes and T lymphocytes in the spleen and lymph nodes [26,27].

Vaccination strategies based on inactivated multi-drug-resistant bacterial strains mostly employ antigen adsorption, predominantly on aluminum hydroxide or Freund's complete adjuvant [22,28–33]. On the other hand, new molecules such as chitosan have been used as vaccine adjuvants. Chitosan is a natural, non-toxic, biodegradable, and biocompatible polymer used in tissue engineering and drug release control that stimulates cellular immune responses and is more efficient and safer than incomplete Freund's adjuvant or hydroxide aluminum [23,34].

Given this scenario, we propose a proof-of-concept study using murine models. We evaluated immune responses using CY-treated mice immunized with a vaccine containing inactivated whole cells of multi-drug-resistant *A. baumannii* adsorbed on aluminum hydroxide-chitosan (mAHC). We intend to contribute to the search for alternatives for protection against *A. baumannii* infections.

2. Materials and methods

2.1. *A. baumannii* Strain and Lethal Dose Determination

The *A. baumannii* strain was provided by the Central Laboratory of Tocantins (Lacen/TO) and stored at -80°C in the Laboratory of Biomolecules and Vaccines of the Federal University of Tocantins (LaBVac/UFT). This strain was isolated in a hospital environment and characterized as a resistant carbapenem class for the blaOXA-23 and blaOXA-51 genes with oxacillinases performed by in-house multiplex polymerase chain reaction (Fiocruz/RJ). The strain was grown in 10 mL of tryptic soy broth (TSB) (soy peptone 17 g/L; casein 3 g/L; dextrose 5 g/L; potassium phosphate monobasic 5 g/L) under stirring at 120 rpm at 37°C for 8 h. At the end of the cultivation, the entire volume was transferred to 90 mL of sterilized tryptic soy broth (TSB) and incubated under agitation at 120 rpm and 37°C for 14 h. Subsequently, 30 mL of culture was centrifuged and washed in saline to standardize serial factor-4 dilutions ($1/4$ – $1/1024$). Three mice were infected intraperitoneally with 500 μL of each of the above-described dilutions to determine the lethal dose and correlation with cell concentration (CFU/mL) [31].

2.2. Inactivation of *A. baumannii* Culture

A. baumannii cultures were incubated overnight in brain heart broth (Merck, Darmstadt, Germany) under agitation at 120 rpm at 37 °C. Cell densities were at the optical density: 600 nm (OD_{600}) = 0.8. Subsequently, they were inactivated using 3% formaldehyde (Alphatec®, São Paulo, Brazil) for 2 h at 30 °C, followed by 16 h at 60 °C, under agitation at 120 rpm. Inactivation was confirmed by adding 1 mL of the inactivated culture to Mueller–Hinton agar (Kasvi®, Paraná, Brazil) and incubating at 37 °C for 48 h [32].

2.3. mAhC and Vaccine Formulation

The mAhC was prepared with prior chitosan solubilization using chitosan powder (Polymar, 81% deacetylation degree) in 0.8% (*v/v*) acetic acid, 0.9% (*w/v*) saline solution, with a ratio of chitosan and aluminum hydroxide of 2:1, respectively. Groups of four animals were employed to assess the number of mAhC doses. Female Swiss mice were inoculated intramuscularly with 100 µL of the mAhC (without *A. baumannii* antigen) in a single shot, at time zero (0 D), with double doses at times (0 D, 14 D) and triple doses at 0 D, 14 D, and 28 D. After the last inoculation, the animals were challenged with a lethal dose of intraperitoneally administered *A. baumannii* (500 µL), and were then monitored for clinical manifestations; then, the Kaplan–Meier survival curve was determined. The vaccine formulation consisted of a cell concentration of *A. baumannii* of 1×10^9 cells.mL^{−1} at 1:1 (*v/v*) with chitosan matrix (1.25%, *w/w*) associated with aluminum hydroxide (1.6 mg) (Dinâmica®, Belo Horizonte, Brazil) [29].

2.4. mAhC and Molecular Docking Calculations

The ligand selected for the molecular docking study was chitosan, and its 3D structures were built in neutral form using Marvin Sketch 18.10, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>, accessed on 31 January 2023). *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide (LPS) amino acid sequences were obtained from the UniProt server database (<http://uniprot.org>, accessed on 31 January 2023). The 3D structures of both proteins were constructed using the homology modeling approach with The Swiss Model Workspace (<https://swissmodel.expasy.org/>, accessed on 31 January 2023) after selecting their respective models using the BLASTp tool. The models were downloaded from The Protein Databank (<https://www.rcsb.org/>, accessed on 31 January 2023), considering quality parameters such as the experimental method, resolution, and R-value, and their complexation with a ligand. We used the Swiss model to verify protein structure breaks and amino acid positioning in the active site [35]. The generated models were validated by inspecting the Ramachandran plots [36,37], in which it was possible to analyze the distribution of the skeletal torsion angles ϕ and ψ responsible for the stereochemical quality of the protein studied, as well as the QMEAN factor [38]. Targets and ligands were prepared for the molecular docking process using Autodock Tools 1.5.7 [39], according to the methodology proposed by Moura et al. (2020) [40]. Using the AutoDock Vina [41] in the docking calculations, nine docking positions were generated for ligands interacting with the targets, returning affinity energy values (kcal/mol). The docking position results were analyzed using PyMOL 2.0 [42] and Discovery Studio 4.5 [43] to select the best position for each ligand inside the protein target using the parameters proposed by Moura et al. (2020) [40].

2.5. Ethical/Legal Requirements and Use of Animals in Experiments

This study used female Swiss mice aged 6 to 8 weeks weighing 17–23 g. They were acquired from the Central Animal Facility of the Federal University of Goiás and placed in the Laboratory of Biomolecules and Vaccines (LaBVac) pre-clinical testing room. The mice were housed in a pathogen-free primary enclosure with free access to food and water; the enclosure was maintained at 24 °C, with odor and light control with a light and dark cycle every 12 h. All animals in this experiment were previously dewormed with access to a 1:20 Ivermectin® solution for seven days. The experiments were conducted following ethical recommendations established by the law of procedures for the scientific use of animals,

being approved for execution by the Animal Ethics and Research Committee of UFT under protocol number 23101.002359/2020-31. Every effort was made to avoid suffering or undue pain; the mice were monitored for weight loss and gain and clinical manifestations such as lethargy, hypothermia, and difficulty breathing. The animals were euthanized using ketamine (300 mg/kg) (Vetbrands[®], Rio de Janeiro, Brazil) and xylazine hydrochloride (22.5 mg/kg) (Syntec[®], Piracicaba, Brazil) [17–19].

2.6. Experimental Design

Mice were given 3 intraperitoneal doses of CY (Genuxal[®] Baxter, São Paulo, Brazil) (150 mg/Kg) for 7 days at 36 h intervals [29]. Blood samples were collected for hematologic analyses at the Pet Shop Dog Veterinary Clinic Center (Gurupi/TO-Brazil). Once the immunosuppression picture was established, 10 immunosuppressed Swiss mice were used to administer 100 µL of the vaccine composition in 3 doses at 0D, 14D, and 28D. Other groups of 10 immunosuppressed mice were inoculated with 100 µL of adjuvant solution (mAhC group) and phosphate-buffered saline (PBS) (non-immunized group) at the corresponding times of 0D, 14D, 28D. Then, 7 days after the final immunization (35D), mice were challenged with 500 µL of a previously defined and intraperitoneally administered lethal dose of *A. baumannii* [31]. The animals were monitored for clinical aspects, and biological samples were collected.

2.7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using *A. baumannii* Cultures

Blood samples from immunosuppressed mice after the last immunization (28D) and after the challenge test (35D) were evaluated to stimulate total IgG production. The ELISA was applied using *A. baumannii* culture, which used 10 mL of TSB for *A. baumannii*, under stirring at 120 rpm at 37 °C, for 8 h (pre-inoculum). Subsequently, the bacterial suspension was washed in saline solution, centrifuged to remove all the culture broth, and used for standardization and antigen fixation [33]. Cell concentration of 10⁶ CFU/mL was used for overnight sensitivity of 96-well microplates (Nunc MaxiSorp during) at 4 °C. After blocking for 1 h with 2% casein-PBS buffer (blocking buffer) at room temperature, the plates were washed 4 times with 0.05% Tween-20-PBS buffer. Serum was diluted at 1:50 with blocking buffer and incubated for 16 h at 4 °C. After washing, anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used at a ratio of 1:2000 in the blocking buffer. After washing, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was added for 15 min and blocked with 2.5 M H₂SO₄ (Dinâmica[®], Belo Horizonte, Brazil). Optical density was measured at 450 nm, and values above the cutoff were considered positive. The mean optical density of serum determined the cutoff point before immunization [17].

2.8. Histopathological Analysis

After finishing the lethal dose analysis test, the histopathological analysis of organs was performed by collecting the liver, lung, and spleen from three non-immunized, mAhC-treated, and immunized animals. The organs were weighed and fixed in a 10% formalin-buffered solution. Subsequently, they were dehydrated in alcohol (Qhemis[®], São Paulo, Brazil), diaphanized in xylene (Synth[®], Porto Alegre, Brazil), and embedded in histological paraffin (Synth[®], Porto Alegre, Brazil). Then, 5-micron sections were made with a microtome, stained in hematoxylin/eosin, and examined under a Leica DM1000 LED optical microscope (Software Application Suite version 4.9.0) with 10, 40, and 100× objectives.

Histological slides of the liver, lung, and spleen were analyzed for tissue damage caused by *A. baumannii* infection, evaluating the presence of edema, degeneration, necrosis, acute inflammation, and hyperemia. Histopathological damage was classified using the lesion score considering the degree of alteration (if absent) when there was no evidence of damage, discrete if it was evident in up to 25% of the field of observation, moderate if greater than 25% but less than 50%, or severe if greater than 50% [17].

As previously described, expansion analyses of white pulp from the spleens of immunosuppressed mice were performed [44]. Histological sections of the spleen were analyzed by capturing images using a Leica Application Suite 4.9.0 photomicroscope. Histological images of white pulp were measured in 10 fields using a 10× objective and ImageJ® 1.47v–2012 software (Bethesda, MD, USA) [44].

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA. The Kruskal–Wallis analysis of variance test was used to compare non-immunized, mAhC-treated, and immunized animals (regarding immunization efficiency). The following parameters were compared: the number of surviving animals according to the Kaplan–Meier survival curves was used with the log-rank test (Mantel–Cox test) and those with symptoms, white blood cell count, and IgG production. Histopathological damage and white pulp expansion were used to compare non-immunized versus adjuvant-treated and non-immunized versus immunized animals. The significance level was $p < 0.05$, and we included the 95% confidence interval. The Student's t -test was used for comparisons of means of experimental parameters.

3. Results

3.1. Sepsis Model of Infection Using *A. baumannii* in CY-Untreated Mice

The survival curves of mice after inoculation with an active culture of *A. baumannii* revealed percentages corresponding to 100%, 50%, and 0% when active suspensions were inoculated intraperitoneally at 10^{-3} (OD₆₀₀ 0.02), 10^{-2} (OD₆₀₀ 0.15), and 10^{-1} (OD₆₀₀ 1.24), respectively, $p < 0.01$ (Figure 1A). After that, mice infections were performed using *A. baumannii* culture at 10^9 – 10^7 CFU/mL. After the first 24 h, *A. baumannii*-infected (4.0×10^8 CFU/mL) mice showed 75% lethality, and this dose was used for the evaluations of vaccine efficacy (Figure 1B), $p < 0.001$.

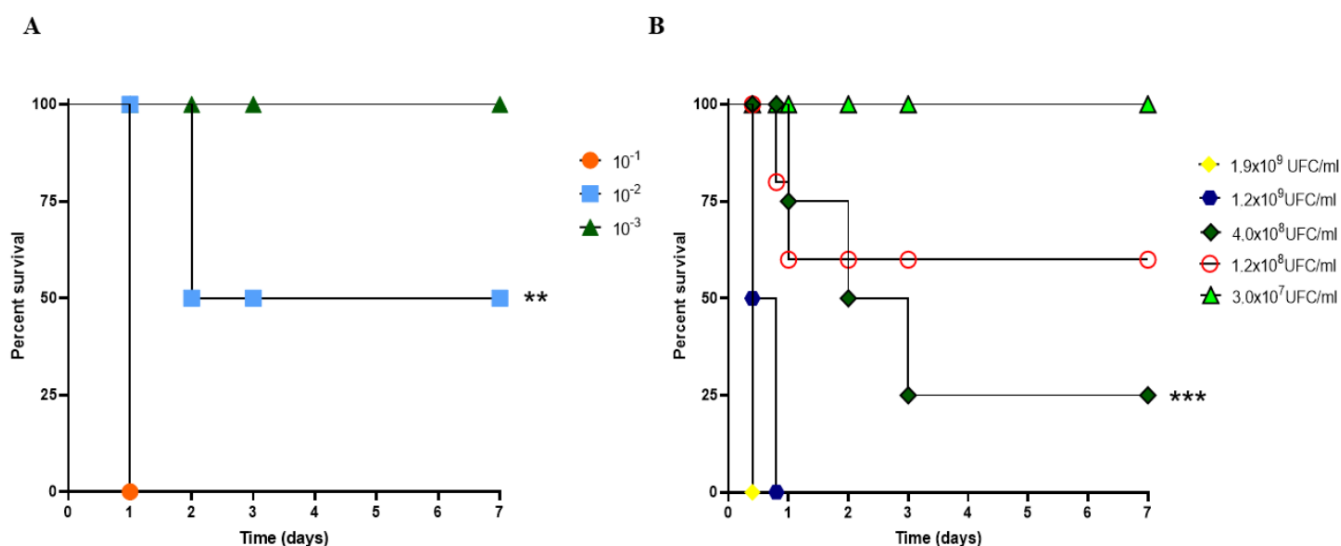


Figure 1. Determination of the lethal dose of *A. baumannii* in CY-untreated mice. (A) The survival rate of mice subjected to bacterial challenge using serial dilution ranged from 10^{-1} to 10^{-3} . (**) $p < 0.01$. (B) Survival curve of mice submitted to bacterial challenge using colony-forming unit (CFU/mL of *A. baumannii*). p -values determined by Kaplan–Meier survival curves were used with the log-rank test (Mantel–Cox test, with six animals per group). (***) $p < 0.001$. Immunized CY-treated mice.

3.2. Determination of mAhC Dose in CY-Untreated Mice

Mice (CY-untreated mice) inoculated with one or more doses of mAhC showed body-weight gain (Figure 2A). However, after inoculation with the lethal dose of *A. baumannii*

(4.0×10^8 CFU/mL), differences in survival percentages were observed, with the highest survival rate obtained when a higher number of doses was applied (Figure 2B). No survivors were observed after an *A. baumannii* challenge test in CY-untreated mice that received a single dose of mAhC or were administered only 1.6 mg/mL aluminum hydroxide solution. CY-untreated mice inoculated with 2 or 3 doses showed a survival rate of 45% ($p < 0.01$), suggesting the potential stimulation and protection of mAhC (Figure 2B).

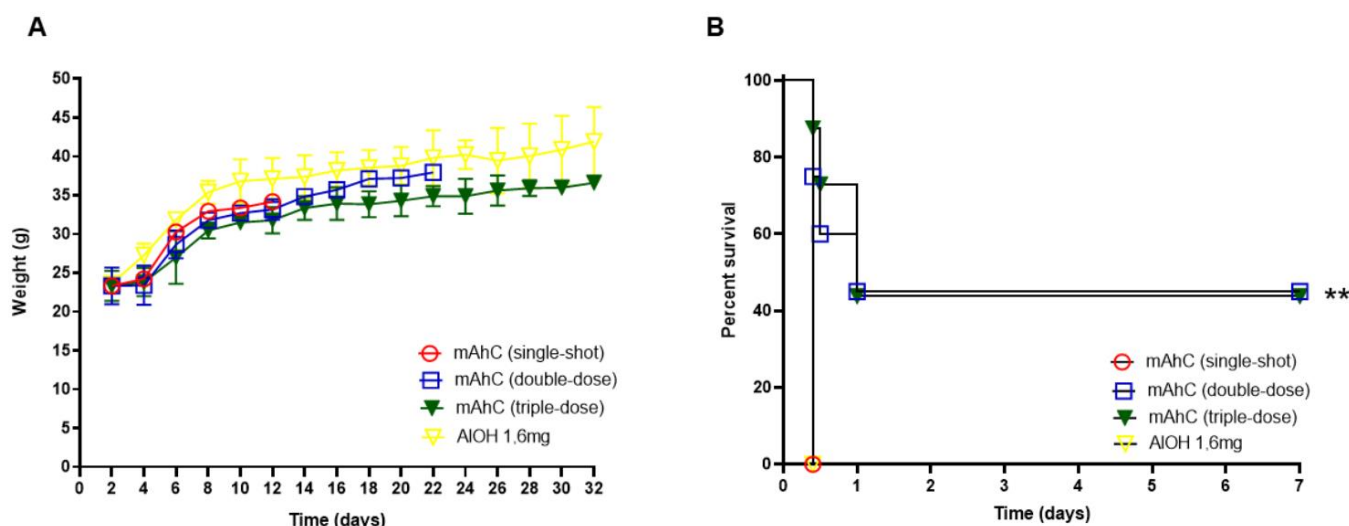


Figure 2. Determination of the number of mAhC doses in CY-untreated mice. (A) Bodyweight monitoring of CY-untreated mice. Data are expressed as the mean and standard deviation. $p < 0.05$. (B) Survival curve of mice subjected to *A. baumannii* challenge (4.0×10^8 CFU/mL). The log-rank test (Mantel–Cox test, with six animals per group) determined the p -value. (**) $p < 0.01$.

3.3. Molecular Docking from MAhC and Bacterial Lipopolysaccharide

The selected templates for homology modeling are shown, highlighting the identities and the validation results with the corresponding Ramachandran favored values and QMEAN. (Table 1). The chitosan complexed with the receptor and formed various interactions with varying affinity energies, as indicated by the docking assays (Table 2). The chitosan ligand showed better affinity energy with target *Acinetobacter baumannii* at -8.4 kcal/mol. The complex formed between the chitosan ligand and the LPS target receptor of the organism *Acinetobacter baumannii* presents a strong interaction with the receptor's amino acids (Figure 3A). This complex showed interactions between the target and ligand of the type: van der Waals, conventional hydrogen bond, carbon–hydrogen bond and pi-donor hydrogen bond (Figure 3B).

Table 1. The target model of the *A. baumannii* lipopolysaccharide was used to analyze the molecular docking with chitosan.

Organism	Target (Uniprot Database)	Template	Identity (%)	Ramachandran Favored (%)	QMEAN
<i>A. baumannii</i>	LPS (D0C7T1)	5IV8	34.02%	90.54%	0.56

Table 2. Molecular docking results for complexes between chitosan and the target of *A. baumannii*.

Organism	Ligand	Affinity Energy (kcal/mol)
<i>A. baumannii</i>	Chitosan	-8.4

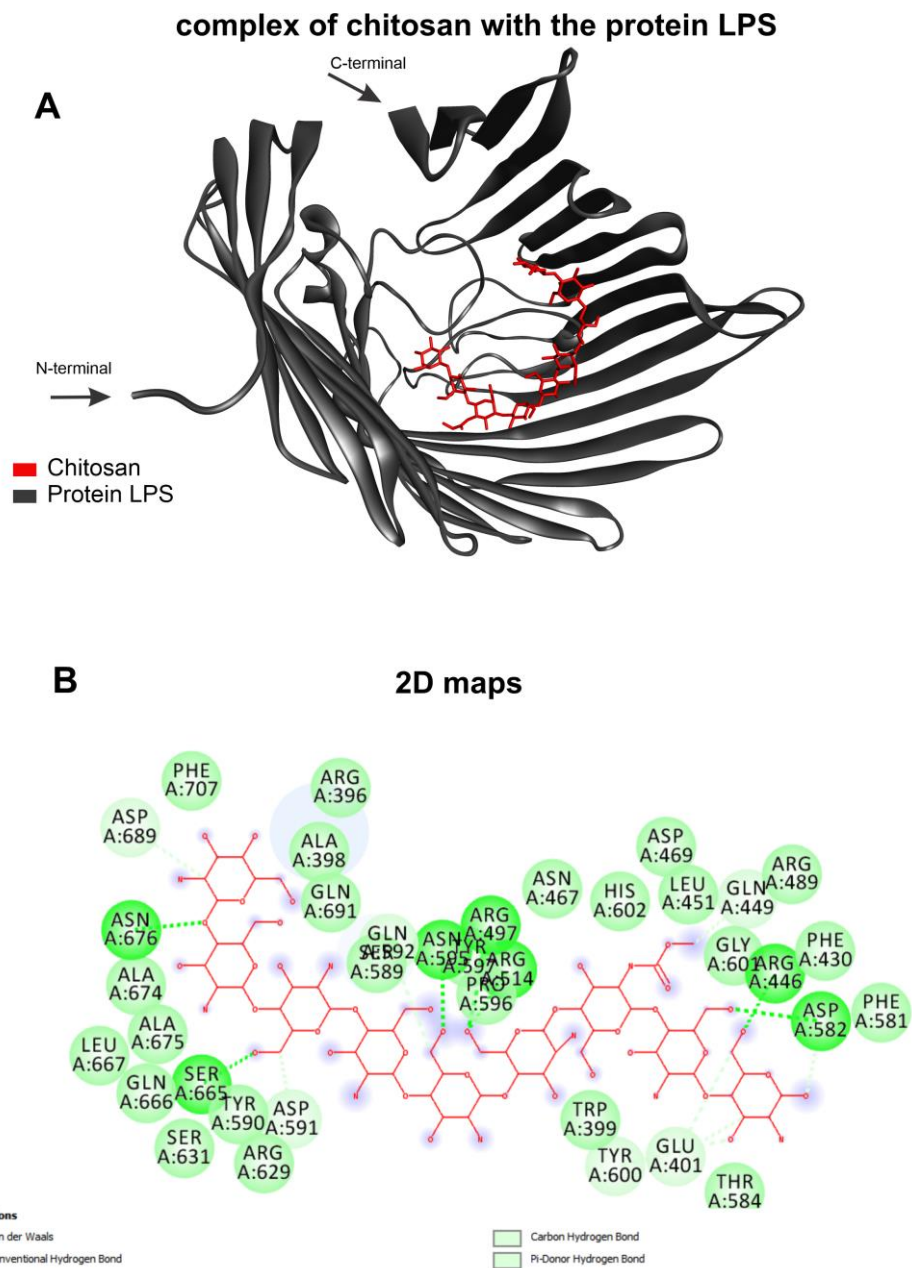


Figure 3. Molecular docking calculations. Chitosan (red) complexed with protein LPS (gray) (A) and 2D maps of molecular interactions with amino acids (B) of *Acinetobacter baumannii*.

3.4. Immunosuppressive Model

We established an immunosuppressive model in Swiss mice using doses of CY, an agent with immunosuppressive properties that causes a decrease in hematologic parameters in the blood and leukopenia. CY promoted a progressive change in the clinical picture after three doses, causing ruffled hair, hair loss, and weight loss ($p < 0.05$) (Figure 4A). Furthermore, about 70% of the CY-treated mice survived and experienced a gradual recovery in body-weight gain (Figure 4B). In addition, these animals showed an exacerbated reduction in the number of total leukocytes, 79% ($p < 0.001$) (Figure 4C), neutrophils ($p < 0.01$) (Figure 4D), lymphocytes ($p < 0.001$) (Figure 4E), and monocytes ($p < 0.05$) (Figure 4F), compared to the group of non-treated mice. Erythrocytes reduction was also evidenced with a decline of 51% compared to the group of CY-treated mice ($p < 0.01$) (Figure 4G) and a drop in hemoglobin concentration ($p < 0.05$) (Figure 4H) and hematocrit ($p < 0.05$) (Figure 4I).

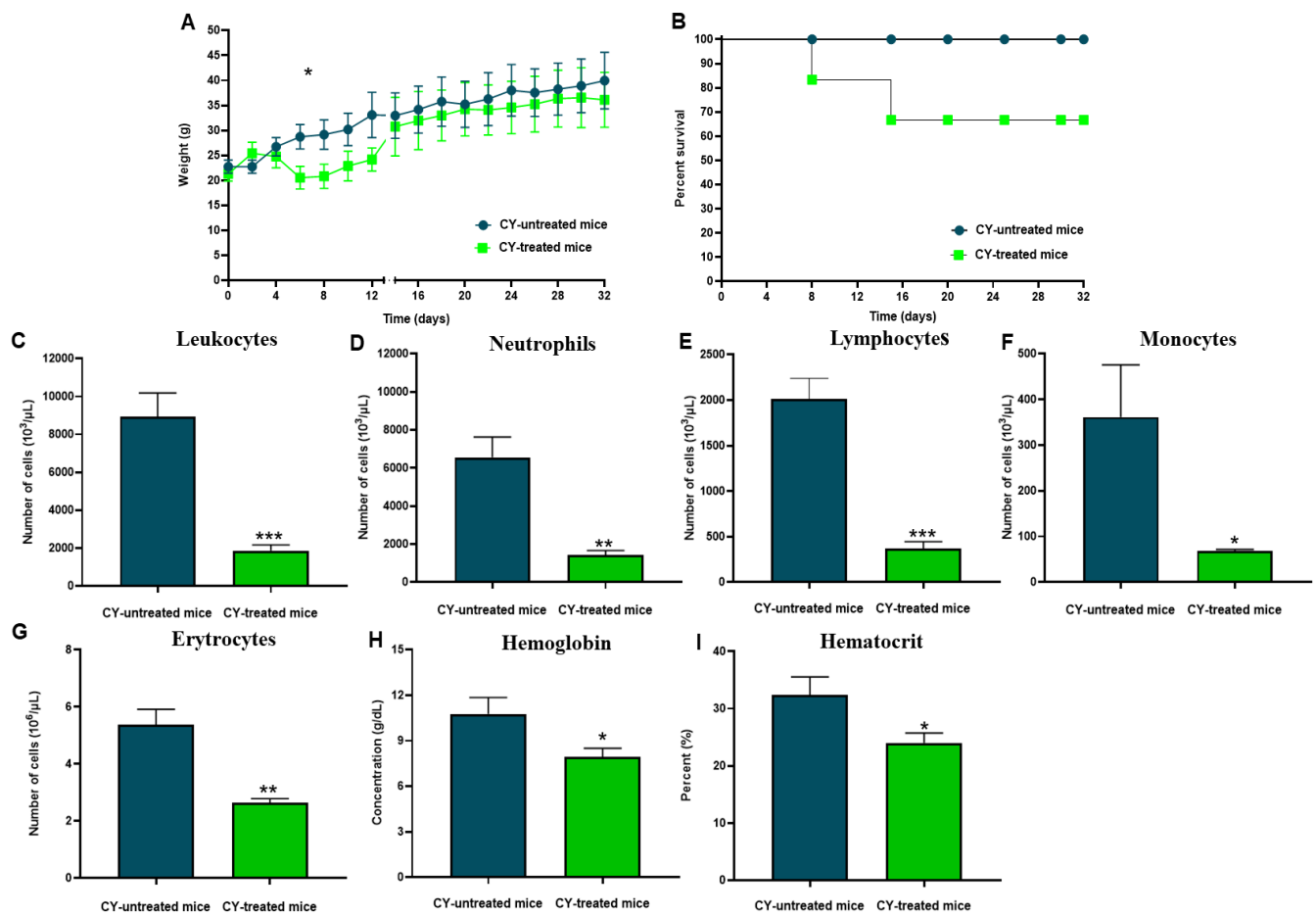


Figure 4. Description of the immunosuppressive model Swiss mice. (A) Bodyweight monitoring of CY-treated and CY-untreated mice using six animals per group. Data are expressed as the mean and standard deviation, (*) $p < 0.05$. (B) Percentage survival of CY-treated mice using cyclophosphamide (150 mg/kg). (C) Leukocyte numbers. (***) $p < 0.001$. (D) The number of neutrophils. (**) $p < 0.01$. (E) Several lymphocytes. (***) $p < 0.001$. (F) The number of monocytes. (*) $p < 0.05$. (G) Several erythrocytes. (**) $p < 0.01$. (H) Hemoglobin. (*) $p < 0.05$. (I) Hematocrit. (*) $p < 0.05$. p values were determined by the t -test.

3.5. Protective Effect of *A. baumannii* Whole-Cell Vaccine Inactivated and Adsorbed on mAhC in CY-Treated Mice

Analysis of the post-immunization humoral response revealed greater stimulation of IgG levels in CY-treated mice inoculated with mAhC alone (adjuvant group) compared to non-immunized CY-treated mice ($p < 0.05$) (Figure 5). However, CY-treated mice immunized with inactivated *A. baumannii* whole-cell vaccine adsorbed with mAhC had IgG levels significantly higher than the levels obtained from CY-treated mice in the adjuvant group ($p < 0.05$), suggesting a greater capacity to stimulate the immune response against *A. baumannii* (Figure 5).

The study of vaccine efficacy after applying the lethal dose of active *A. baumannii* (4×10^8 CFU/mL) revealed a lethality rate of 100%, corresponding to non-immunized and CY-treated mice (control group) ($p < 0.001$). In contrast, in immunized CY-treated mice, the survival rate was 85%, a value that differed from the survival percentages of CY-treated mice in the mAhC group (adjuvant) (45%) ($p < 0.05$) (Figure 6A). In addition, immunized CY-treated mice showed higher levels of IgG compared to the control and adjuvant groups (Figure 6B) ($p < 0.05$), as well as a more significant expansion of white pulp (Figure 6C,D).

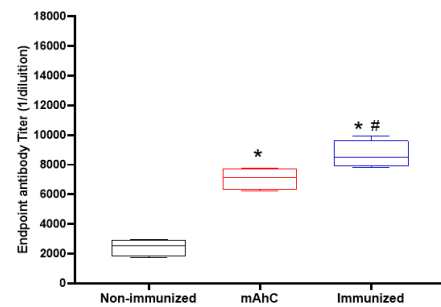


Figure 5. Stimulation of the humoral response of inactivated *A. baumannii* whole-cell vaccine adsorbed on mAhC in CY-treated mice. Data refer to the levels of total IgG produced before the application of a lethal dose of *A. baumannii* (4.0×10^8 CFU/mL) in immunized CY-treated mice, non-immunized CY-treated mice, and CY-treated mice inoculated with mAhC using 6 animals per group. (*) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC using 6 animals per group. (*#) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC.

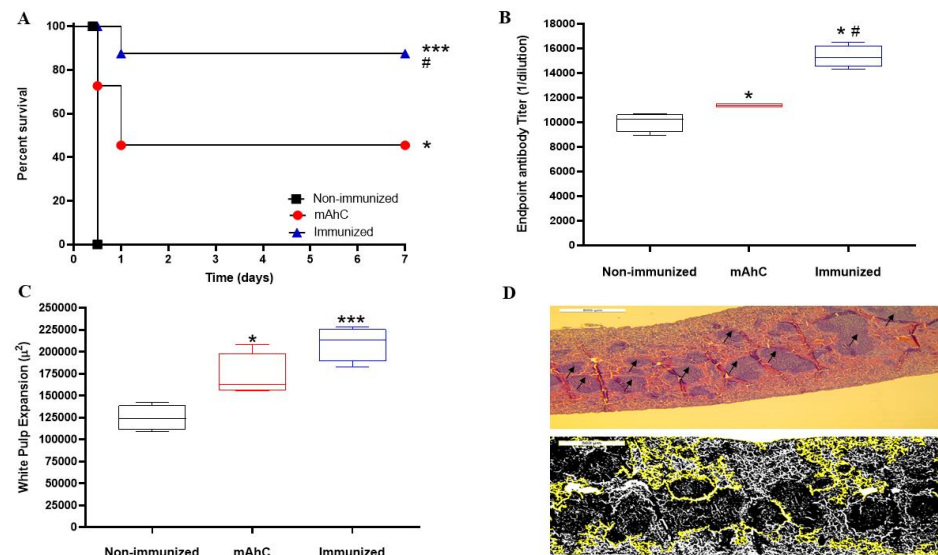


Figure 6. Efficiency test of whole-cell vaccine inactivated and adsorbed on mAhC in CY-treated mice. (A) Survival curve of experimental groups using CY-treated mice after a lethal dose of *A. baumannii* (4.0×10^8 CFU/mL). The log-rank test (Mantel–Cox test, with six animals per group) determined the p -value. (*) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC using six animals per group. (***) $p < 0.001$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. immunized CY-treated mice and (#) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC. (B) Humoral response after a lethal dose of *A. baumannii* (4.0×10^8 CFU/mL). Data refer to the total IgG levels produced from immunized CY-treated mice, non-immunized CY-treated mice, and post-lethal CY-treated mice inoculated with mAhC. (*) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC and non-immunized CY-treated mice vs. immunized CY-treated mice. $p < 0.05$ (*)# represents a comparative analysis between immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC. (C,D) Measurement and imaging of white pulp expansion of immunosuppressed mice. (*) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. those inoculated with mAhC. (***) $p < 0.01$ represents a comparative analysis between immunized CY-treated mice vs. CY-treated mice inoculated with mAhC. ImageJ employee software is available (<https://imagej.nih.gov/ij/> accessed on 31 January 2023).

3.6. Histopathological Analysis of the Sepsis Model of *A. baumannii* Infection in CY-Treated Mice

The sepsis model of *A. baumannii* infection showed tissue damage in the liver, spleens, and lungs in CY-treated mice, the non-immunized mice, and the mAhC (Figure 7). By comparison, there were no significant differences between the liver and lung weights of these groups (Figure 7A,B). In terms of the weight of the spleens of immunized CY-treated mice, there were significant differences from the non-immunized CY-treated or adjuvant groups ($p < 0.05$) (Figure 7C). In addition, more substantial expansion of the white pulp was observed in this group ($p < 0.01$) and the adjuvant group ($p < 0.05$) (Figure 7D). The expansion of the white pulp is related to the presence of periarteriolar and follicular hyperplasia caused by the antigenic stimulus and immune response (Figures 6D and 7D). The histopathological findings revealed greater severity in the liver with hydropic degeneration and decreased sinusoids, and interstitial pneumonia with a mixed inflammatory infiltrate and congestion (of minor severity in the mAhC and immunized groups) in the lung. Additionally, hemorrhage, congestion, and white pulp lymphoid hyperplasia were detected in the spleen (Figure 7D).

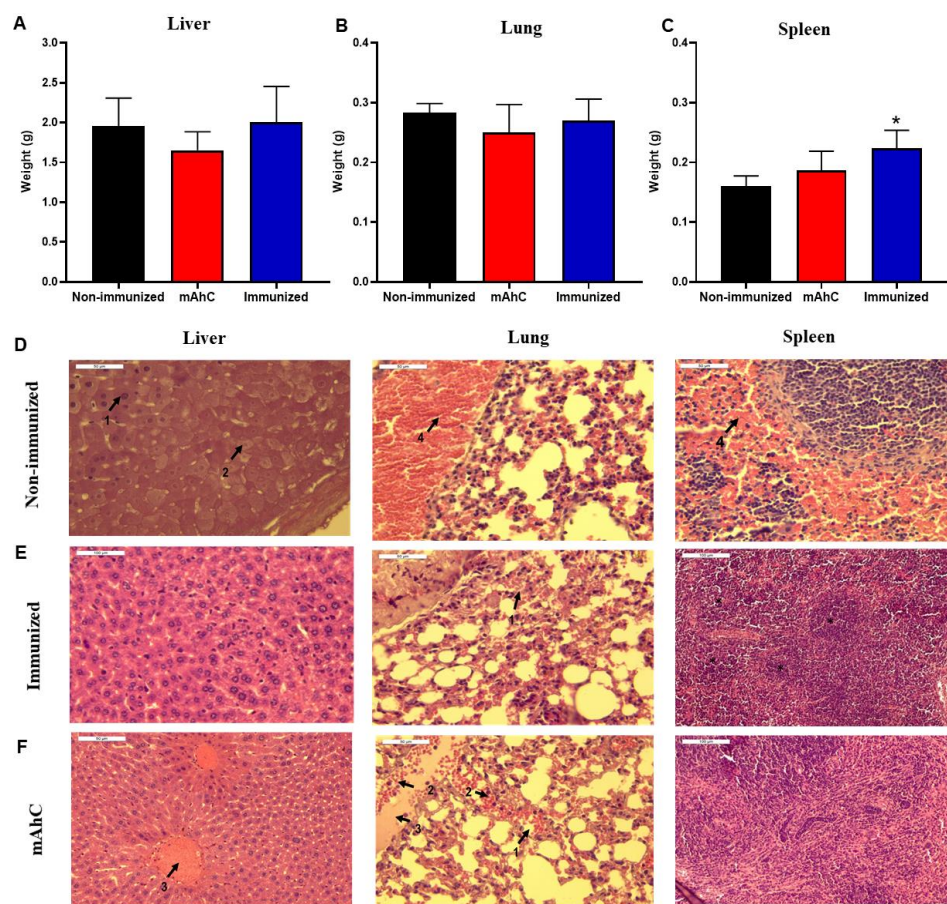


Figure 7. Histopathological findings of *A. baumannii* infection in CY-treated mice. (A–C) Determination of the lung, liver, and spleen weights of CY-treated mice after the application of a lethal dose of *A. baumannii* (4.0×10^8 CFU/mL) using 6 animals per group. Data are expressed as the mean and standard deviation. (*) $p < 0.05$ represents a comparative analysis between non-immunized CY-treated mice vs. immunized CY-treated mice. (D–F) Histopathological findings of experimental groups using CY-treated mice after the application of a lethal dose of *A. baumannii* (4.0×10^8 CFU/mL) stained by the hematoxylin-eosin technique. Data: D1: necrosis (40 $\times$), D2: hydropic Degeneration (40 $\times$), D3: hyperemia (40 $\times$), D4: hemorrhage (40 $\times$), E1: hemorrhage (40 $\times$), F1: pulmonary hemorrhage (40 $\times$), F2: polymorphonuclear neutrophils (40 $\times$), F3: acute inflammation (40 $\times$), F4: hyperemia (40 $\times$), F* white pulp.

4. Discussion

A. baumannii is a critical emerging pathogen that is responsible for nosocomial pneumonia in healthcare settings; it has become a global emergency [45–47]. Murine models have contributed to elucidating the mechanisms associated with pathogenesis and understanding the pathogen–host relationship of infections caused by *A. baumannii* in sepsis, pneumonia, and immunosuppression models [17,19,24]. CY is a synthetic antineoplastic agent widely used as an immunosuppressive drug in mice, which causes a cytostatic effect and inhibits the rapid cycle of immune cells, consequently causing granulopenia [23,25,26]. *A. baumannii*-infected mice may show changes consistent with pneumonia, acute inflammation with mild-to-severe inflammatory infiltration of polymorphonuclear cells, segmental abscess formation, and mild-to-moderate infiltration of alveolar macrophages when treated with an immunosuppressant [48]. Here, we used an *A. baumannii* sepsis model in CY-treated mice to understand the behavior of multi-drug-resistant strains in infections and to evaluate new vaccine strategies based on inactivated bacterial strains adsorbed on mAhC.

Preliminarily, we revealed the immunosuppression of immunocompetent mice that showed signs of infection and presented with ruffled and shedding animal hair, loss in body weight, and lethargy, accompanied by a reduction in leukocytes (neutrophils, lymphocytes, and monocytes), erythrocytes, and hemoglobin and the percentage of hematocrit (Figure 4). Our data corroborate those of other studies that show low concentrations of circulating polymorphonuclear neutrophils, followed by a marked and progressive increase leading to greater susceptibility of immunosuppressed mice [23,29,49] and distinct alterations of macrophages and lymphocytes with lower participation in the first hours of infection, followed by baseline levels.

The expansion of the follicular area is characterized by increased cellularity of rounded and regular nuclear membranes stimulated by immunization, leading to subsequent B cell proliferation [17,28,50,51]. The present study revealed the expansion of spleen white pulp in the immunized CY-treated mice groups with the production of IgG antibodies. In addition, the adequate protection of 85% after a lethal dose of multi-drug-resistant *A. baumannii* suggests that our murine model was effective in vaccine protection in immunized animals (Figure 6B,C), as reported in previous studies [23,28,30].

Another relevant aspect observed here was the greater tissue protection of groups of immunized CY-treated mice because non-immunized CY-treated mice or adjuvant-inoculated-CY-treated mice presented histopathological findings of edema, hemorrhage, hydropic degeneration, necrosis, and hyperemia in liver sections, as well as edema, hemorrhage, and hyperemia in lung sections. There were signs of acute infection in the non-immunized CY-treated mice and adjuvant-inoculated-CY-treated mice groups after infection, revealing characteristic signs of the pathology with death within 24 h. In contrast, the immunized CY-treated mice groups showed adequate protection after receiving a lethal dose of multi-drug-resistant *A. baumannii*. Our data corroborate previous infection studies in murine sepsis models [49,52,53].

Splenic alterations caused by *A. baumannii* infections are accompanied by white pulp damage, leukocyte apoptosis, embolus formation, clusters of degenerated or necrotic leukocytes in the white pulp areas, and the appearance of moderate congestion in the medullary region [49,54]. Infiltration of mixed inflammatory cells in the perivascular and peribronchial space, with the presence of polymorphonuclear granulocytes and mononuclear cells in the airway lumen, especially in the first hours of infection, is followed by vasodilation, congestion, and hemorrhage, which leads to the destruction of alveolar structures of the lung after 48 h of infection [49,52,53,55,56]. Our histopathological findings highlight the importance and adequacy of the sepsis model, evidencing vaccine protection, the stimulation of the immune response, and the consequent tissue protection of the livers, spleens, and lungs of immunized animals.

The mAhC used here contributed to the stimulation of IgG production of immunized CY-treated mice groups and was superior to non-immunized CY-treated mice groups when used at three doses/animal. Previous studies demonstrated the stimulation of IgG produc-

tion in immunized mice using protein antigens adsorbed exclusively on chitosan [34,57,58] or exclusively on aluminum hydroxide or Freund's adjuvant [15,30,33,59]. However, the present study is the first to associate aluminum hydroxide and chitosan for the adsorption of *A. baumannii* antigens on mAhC, revealing a vaccine adjuvant that stimulates the immune system response of immunosuppressed mice.

Despite the relevance of the efficacy of a new vaccine formulation with inactivated multi-drug-resistant *A. baumannii* that is whole-cell adsorbed on mAhC, issues remain that have not been fully elucidated. As described here, we recorded high stimulation of the immune response by measuring total IgG levels. However, we did not determine IgG1 and IgG2c levels, which participate in eliminating pathogens and reducing postoperative bacterial loads [17,32,33]. We did not measure cytokine profiles, which may be necessary for elucidating the mechanism of pathogen elimination and vaccine protection. Thus, future studies should address these issues.

5. Conclusions

We demonstrated the role of an *A. baumannii* sepsis model in mice and the reduction in neutrophil numbers before immunization (treated with CY). The inactivated and adsorbed multi-drug *A. baumannii* whole-cell vaccine (mAhC) stimulated the immune response and protected immunized animals, even after a challenge with a lethal dose. These findings provide the basis for studies on minimizing the impacts of *A. baumannii* infections.

Author Contributions: Conceptualization, T.T.D., M.K.C.F., H.d.S.B., B.A., G.R.d.S. and A.S.R.C.; data curation, S.A.-F.; formal analysis, H.d.S.B., E.W.S.C., M.G.S., G.R.d.S., P.B.d.M., Y.O.C., L.A.M.M. and P.A.N.; investigation, W.d.S.M., G.R.d.S. and A.S.R.C.; methodology, T.T.D., M.K.C.F., H.d.S.B., E.W.S.C., W.d.S.M., B.A., P.B.d.M., E.F.d.S., Y.O.C., L.A.M.M., P.A.N., S.A.-F., E.N.A., S.E., C.R.F.M., E.E.O., I.V.B., K.F.V. and A.S.R.C.; resources, T.T.D.; validation, M.G.S. and P.A.N.; writing—review and editing, S.E., C.R.F.M., E.E.O., I.V.B., K.F.V. and A.S.R.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Tocantins State Government/Tocantins State Foundation for Research (FAPT-TO)/ Secretariat of Planning and Budget (SEPLAN-TO), Graduate Program for Biotechnology, Graduate Program for Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazon and the Vice-Rector of Research from the Federal University of Tocantins supported this research. ASRC (FAPT/PPSUS837598/2016/DESER/2022; CNPq 315095/2018-0/ 305589/2021-0) CRFM (CNPq 302917/2019-5); SE (CNPq 304033/2021-9); EEO (CNPq 308576/2018-7 and 427304/2018-0; FAPEMIG APQ 03771-18).

Institutional Review Board Statement: The experiments were conducted following ethical recommendations established by the law of procedures for the scientific use of animals, being approved for execution by the Animal Ethics and Research Committee of the Federal University of Tocantins under protocol number 23101.002359/2020-31. All efforts were made to avoid suffering or undue pain. The animals were monitored for clinical aspects, loss and gain in body weight, and the first clinical signs, including lethargy, hypothermia, and difficulty breathing. The animals were euthanized using the protocol described in the material and methods.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Giamarellou, H.; Antoniadou, A.; Kanellakopoulou, K. *Acinetobacter baumannii*: A universal threat to public health? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *3*, 106–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lesho, E.; Eun-Jeong, Y.; McGann, P.; Snesrud, E.; Kwak, Y.; Milillo, M.; Onmus-Leone, F.; Preston, L.; St Clair, K.; Nikolich, M.; et al. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1142–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Wong, D.; Nielsen, T.B.; Bonomo, R.A.; Pantapalangkoor, P.; Luna, B.; Spellberg, B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 409–447. [CrossRef] [PubMed]
4. Castilho, S.R.A.; Godoy, C.S.D.M.; Guilarde, A.O.; Cardoso, J.L.; André, M.C.P.; Junqueira-Kipnis, A.P.; Kipnis, A. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiania, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176790. [CrossRef] [PubMed]
5. Munier, A.L.; Biard, L.; Legrand, M.; Rousseau, C.; Lafaurie, M.; Donay, J.L.; Molina, J.M. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. *International J. Infect. Dis.* **2019**, *79*, 179–184. [CrossRef]
6. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Monnet, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef]
7. Zarrilli, R.; Pournaras, S.; Giannouli, M.; Tsakris, A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**, *41*, 11–19. [CrossRef]
8. Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* **2021**, *10*, 1310. [CrossRef]
9. Kyriakidis, I.; Vasileiou, E.; Pana, Z.D.; Tragiannidis, A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens* **2021**, *10*, 373. [CrossRef]
10. Lin, C.Y.; Chen, Y.M.; Lin, M.C.; Chang, Y.P.; Chao, T.Y.; Wang, C.C.; Tsai, Y.L.; Shen, L.S.; Li, C.L.; Lin, A.S. Risk factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* recurrence after successful eradication in ventilated patients. *Biomed. J.* **2016**, *39*, 130–138. [CrossRef]
11. Yang, Q.; Rui, Y. Two multiplex real-time PCR assays to detect and differentiate *Acinetobacter baumannii* and non-Baumannii *Acinetobacter* spp. carrying bla NDM, bla OXA-23-like, bla OXA-40-like, bla OXA-51-like, and bla OXA-58-like genes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158958. [CrossRef]
12. 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. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 55. [CrossRef] [PubMed]
13. Brasil, Instrução normativa 23 M.A.P.A. Diário Oficial da União. Available online: <https://www.in.gov.br/servicos/diario-oficial-da-uniao> (accessed on 31 January 2023).
14. Sobrinho, E.M.; Cangussu, A.S.R.; Brandi, I.V.; Sari, R.S.; Almeida, A.C.; Colen, F.; Quintilio, W.; Santos, H.O. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for epsilon antitoxin determination in serum of immunized rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *138*, 129–133. [CrossRef] [PubMed]
15. McConnell, M.J.; Actis, L.; Pachón, J. *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 130–155. [CrossRef] [PubMed]
16. Brandi, I.V.; Mozzer, O.D.; Vander, J.E.; Passos, F.J.V.; Passos, F.M.L.; Cangussu, A.S.R.; Sobrinho, E.M. Growth conditions of *Clostridium perfringens* type B for production of toxins used to obtain veterinary vaccines. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 1737–1742. [CrossRef]
17. Cangussu, A.S.R.; Mariúba, L.A.M.; Lalwani, P.; Pereira, K.D.; Astolphi-Filho, E.S.; Orlandi, P.P.; Nogueira, P.A. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. *Vet. Res.* **2018**, *49*, 6. [CrossRef]
18. Santos, E.M.S.; Almeida, A.C.; Santos, H.O.; Cangussu, A.S.R.; Costa, K.S.; Alves, J.N.; Barbosa, L.C.B.; Aguiar, R.W.S. Mechanism of *Brassica oleracea* performance in bovine infectious mastitis by bioinformatic analysis. *Microb. Pathog.* **2019**, *129*, 19–29. [CrossRef]
19. Felix, M.K.C.; Deusdará, T.T.; Santos, L.S.S.; Aguiar, R.W.S.; Corrêa, R.F.T.; Brandi, I.V.; Cangussu, A.S.R. Inactivated alpha toxin from *Clostridium novyi* type B in nano-emulsion protect partially protects Swiss mice from lethal alpha toxin challenge. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14082. [CrossRef]
20. Brito, H.S.; Alencar, F.C.; Alburquerque, B.; Silva, M.G.; Félix, M.K.C.; Mulholland, D.S.; Oliveira, E.E.; Mariúba, L.A.M.; Santos, E.M.S.; Brandi, I.V.; et al. Pathologic findings on ruminant enteric clostridial diseases reveal specificities and differences among iota and iota-like toxins. *Rev. Cienc. Agríc.* **2021**, *38*, 157–174. [CrossRef]
21. Chen, W. Host innate immune responses to *Acinetobacter baumannii* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 486. [CrossRef]
22. Cabral, M.P.; García, P.; Beceiro, A.; Rumbo, C.; Pérez, A.; Moscoso, M.; Bou, G. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15480. [CrossRef]
23. Dollery, S.J.; Zurawski, D.V.; Gaidamakova, E.K.; Matrosova, V.Y.; Tobin, J.K.; Wiggins, T.J.; Tobin, G.J. Radiation-Inactivated *Acinetobacter baumannii* Vaccine Candidates. *Vaccines* **2021**, *9*, 96. [CrossRef] [PubMed]
24. Tsai, C.Y.; Hsieh, S.C.; Liu, C.W.; Lu, C.S.; Wu, C.H.; Liao, H.T.; Chen, M.H.; Li, K.J.; Shen, C.Y.; Kuo, Y.M.; et al. Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils, Immune, and Non-Immune Cells via Released Cytokines, Granule Proteins, Microvesicles, and Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3119. [CrossRef]
25. Diehl, R.; Ferrara, F.; Müller, C.; Dreyer, A.Y.; McLeod, D.D.; Fricke, S.; Boltze, J. Immunosuppression for in vivo research: State-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell. Mol. Immunol.* **2017**, *14*, 146–179. [CrossRef] [PubMed]

26. Liu, A.R.; Du, W.J.; Xie, J.F.; Xu, J.Y.; Huang, Y.Z.; Qiu, H.B.; Yang, Y. Role of immunodeficiency in *Acinetobacter baumannii* associated pneumonia in mice. *Chin. Med.* **2020**, *133*, 2161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Ikezawa, Y.; Nakazawa, M.; Tamura, C.; Takahashi, K.; Minami, M.; Ikezawa, Z. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25+ CD4+ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *J. Dermatol. Sci.* **2005**, *39*, 105–112. [\[CrossRef\]](#)
28. McConnell, M.J.; Pachón, J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. *Vaccine* **2010**, *29*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
29. Jin, P.; Sun, F.; Liu, Q.; Wang, Q.; Zhang, Y.; Liu, X. An oral vaccine based on chitosan/aluminum adjuvant induces both local and systemic immune responses in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vaccine* **2021**, *39*, 7477–7484. [\[CrossRef\]](#)
30. Luo, G.; Lin, L.; Ibrahim, A.S.; Baquir, B.; Pantapalangkoor, P.; Bonomo, R.A.; Spellberg, B. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29446. [\[CrossRef\]](#)
31. García-Quintanilla, M.; Pulido, M.R.; Pachón, J.; McConnell, M.J. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114410. [\[CrossRef\]](#)
32. Shu, M.H.; MatRahim, N.; NorAmdan, N.; Pang, S.P.; Hashim, S.H.; Phoon, W.H.; AbuBakar, S. An inactivated antibiotic-exposed whole-cell vaccine enhances bactericidal activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22332. [\[CrossRef\]](#)
33. Ramezanalizadeh, F.; Owlia, P.; Rasooli, I. Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine* **2020**, *38*, 5436–5446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sari, R.S.; Almeida, A.C.; Cangussu, A.S.R.; Jorge, E.V.; Mozzer, D.O.; Santos, H.O.; Quintilio, W.; Brandi, I.V.; Andrade, V.A.; Miguel, A.S.M.; et al. Anti-botulism single-shot vaccine using chitosan for protein encapsulation by simple coacervation. *Anaerobe* **2016**, *42*, 182–187. [\[CrossRef\]](#)
35. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 296–303. [\[CrossRef\]](#)
36. Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283–437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Haas, J.; Barbato, A.; Behringer, D.; Studer, G.; Roth, S.; Bertoni, M.; Mostaguir, K.; Gumienny, R.; Schwede, T. Continuous Automated Model Evaluation (CAMEO) complementing the critical assessment of structure prediction in CASP12. *Proteins* **2018**, *86*, 387–398. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 343–350. [\[CrossRef\]](#)
39. Sanner, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 57–61.
40. Moura, W.S.; Souza, S.R.; Campos, F.S.; Cangussu, A.S.R.; Santos, E.M.S.; Andrade, B.S.; Viana, K.F.; Haddi, K.; Oliveira, E.E.; Nascimento, V.L.; et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *46*, 112142. [\[CrossRef\]](#)
41. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [\[CrossRef\]](#)
42. Schrodinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*; Schrodinger, LLC: New York, NY, USA, 2018.
43. Biovia, D.S. *Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017*; Dassault Systemes: San Diego, CA, USA, 2017.
44. Papadopoulos, F.; Spinelli, M.; Valente, S.; Foroni, L.; Orrico, C.; Pasquinelli, G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using imageJ. *Ultrastruct. Pathol.* **2007**, *31*, 401–407. [\[CrossRef\]](#)
45. Alos, J.I. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2014**, *33*, 692–699. [\[CrossRef\]](#)
46. Borek, A.J.; Wanat, M.; Sallis, A.; Ashiru-Oredope, D.; Atkins, L.; Beech, E.; Tonkin-Crine, S. How can national antimicrobial stewardship interventions in primary care be improved? A stakeholder consultation. *Antibiotics* **2019**, *8*, 207. [\[CrossRef\]](#)
47. Miranda, C.; Silva, V.; Igrejas, P.G.P. Impact of European pet antibiotic use on enterococci and staphylococci antimicrobial resistance and human health. *Fut. Microbiol.* **2021**, *16*, 185–203. [\[CrossRef\]](#)
48. Rodríguez-Hernández, M.J.; Pachón, J.; Pichardo, C.; Cuberos, L.; Ibáñez-Martínez, J.; García-Curiel, A.; Jiménez-Mejías, M.E. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 493–501. [\[CrossRef\]](#)
49. Harris, G.; KuoLee, R.; Lam, C.K.; Kanzaki, G.; Patel, G.B.; Xu, H.H.; Chen, W. A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3601–3613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Suttie, A.W. Histopathology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* **2006**, *34*, 466–503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Elmore, S.A. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* **2006**, *34*, 648–655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. He, S.; He, H.; Chen, Y.; Chen, Y.; Wang, W.; Yu, D. In vitro and in vivo analysis of antimicrobial agents alone and in combination against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 507. [\[CrossRef\]](#)
53. Na, S.H.; Oh, M.H.; Jeon, H.; Lee, Y.K.; Lee, B.; Shin, M.; Lee, J.C. Imaging of bioluminescent *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Microb. Pathog.* **2019**, *137*, 103784. [\[CrossRef\]](#)

54. Ketter, P.M.; Guentzel, M.N.; Schaffer, B.; Herzig, M.; Wu, X.; Montgomery, R.K.; Arulanandam, B.P. Severe *Acinetobacter baumannii* sepsis is associated with elevation of pentraxin 3. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3910–3918. [\[CrossRef\]](#)
55. KuoLee, R.; Harris, G.; Yan, H.; Xu, H.H.; Conlan, W.J.; Patel, G.B.; Chen, W. Intranasal immunization protects against *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia in mice. *Vaccine* **2015**, *33*, 260–267. [\[CrossRef\]](#)
56. Bergamini, G.; Perico, M.E.; Di Palma, S.; Sabatini, D.; Andreetta, F.; Defazio, R.; Ferrari, L. Mouse pneumonia model by *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant strains: Comparison between intranasal inoculation, intratracheal instillation and oropharyngeal aspiration techniques. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0260627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Gilavand, F.; Marzban, A.; Ebrahimipour, G.; Soleimani, N.; Goudarzi, M. Designation of chitosan nano-vaccine based on MxiH antigen of *Shigella flexneri* with increased immunization capacity. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *232*, 115813. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Du, X.; Xue, J.; Jiang, M.; Lin, S.; Huang, Y.; Deng, K.; Feng, G. A multiepitope peptide, rOmp22, encapsulated in chitosan-PLGA nanoparticles as a candidate vaccine against *Acinetobacter baumannii* infection. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 1819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Pulido, M.R.; García-Quintanilla, M.; Pachón, J.; McConnell, M.J. A Lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. *Vaccine* **2020**, *38*, 719–724. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.