



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE
Acinetobacter baumannii EM PACIENTES COM COVID-19**

São José do Rio Preto
2023

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE
Acinetobacter baumannii EM PACIENTES COM COVID-19**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto
2023

Silva, Caroline Rodrigues da
Caracterização molecular e fenotípica de *Acinetobacter baumannii* em pacientes com COVID-19/ Caroline Rodrigues da Silva
São José do Rio Preto, 2023.
91 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira

1. *Acinetobacter baumannii*; 2. COVID-19; 3. Tipagem molecular;
4. Resistência.

CAROLINE RODRIGUES DA SILVA

Caracterização molecular e fenotípica de *Acinetobacter
baumannii* em pacientes com COVID-19

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

2º Examinador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman

3º Examinador Prof^a. Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia

4º Examinador: Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira

5º Examinador Prof^a. Dr^a. Suzana Margareth Ajeje Lobo

Suplente: Prof^a. Dr^a. Milena Polotto de Santi

Suplente Prof^a. Dr^a. e Fernanda Modesto Tolentino Binhardi

São José do Rio Preto, 1 de Novembro de 2023

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
EPÍGRAFE	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 COVID-19 e Infecções Secundárias.....	2
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	4
2.3 <i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos (CRAB) na COVID-19.....	6
2.4 Mecanismos de Resistência aos beta-lactâmicos	7
2.5 Aminoglicosídeos.....	9
2.5.1 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos	10
2.6 Técnicas moleculares para avaliar a relação clonal de <i>A. baumannii</i>	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Seleção de Pacientes e Coleta de Dados	14
3.2 Classificação das Infecções	15
3.3 Análise Estatística	15
3.4 Coleta dos Isolados, Identificação e Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos	15
3.5 Extração de DNA e PCR para Identificação de Genes de Resistência	17
3.5.1 Detecção dos genes de beta-lactamases.....	18
3.5.2 Sequência de inserção ISAbal.....	19
3.5.3 16S rRNA metiltransferases	20
3.6 Tipagem Molecular	21
3.6.1 <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	21
3.6.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	23
3.7 Sequenciamento completo do genoma (<i>Whole-Genome Shotgun/ WGS</i>) ...	24
3.7.1 Análise bioinformática das Sequências de “ <i>Draft Genome</i> ”	25
3.8 Formação de Biofilme.....	25
4 RESULTADOS	27

4.1	Características dos Pacientes	27
4.2	Características das Culturas.....	30
4.3	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	31
4.4	Genes de Resistência.....	36
4.5	Tipagem Molecular	36
4.6	Formação de Biofilme.....	38
4.7	Análise de WGS (<i>Whole Genome Sequencing</i>)	38
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8	APÊNDICES	65
8.1	Apêndice A – Características gerais dos genomas das quatro cepas representativas de <i>A. baumannii</i>	65
8.2	Apêndice B – Perfil alélico baseado no esquema de MLST Oxford/Pasteur das quatro cepas representativas de <i>A. baumannii</i>	66
8.3	Apêndice C – Presença de genes de resistência aos antibióticos nos quatro isolados representativos de <i>A. baumannii</i>	67
8.4	Apêndice D – Presença de genes de virulência nos quatro isolados representativos de <i>A. baumannii</i>	68
9	ANEXOS.....	69

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão à minha orientadora, Dra. Mara Nogueira, pela generosidade de abrir as portas de seu laboratório há cinco anos atrás, pela orientação valiosa e pela dedicação na elaboração desta tese.

À minha família, Delmicio e Lucineia, meus pais, agradeço imensamente pelo apoio incondicional ao longo da vida e de toda essa jornada acadêmica.

Aos meus irmãos, Camila, Jennifer e Lucas, cujo companheirismo e amor foram fundamentais em cada etapa desse percurso. Um agradecimento especial também ao meu sobrinho Nicolas, nosso caçula, que cresce tão rápido e traz tanta alegria às nossas vidas.

Agradeço ao meu namorado, Fernando, cujo amor e cuidado têm sido fundamentais para meu bem-estar e sucesso nesta jornada acadêmica.

Agradeço de coração aos meus companheiros de laboratório, Letícia Andrade, Marlon, Katia e Kalir, pelos momentos de descontração e risadas, pelo auxílio inestimável nos experimentos e pelo aprendizado compartilhado.

Meus sinceros agradecimentos também a todos os estagiários que me acompanharam e apoiaram durante esses cinco anos no Centro de Investigação de Microrganismos, em especial a Bia, Larissa e Matheus, pelas pesquisas minuciosas nos prontuários.

À Luciana e à Valéria, meu reconhecimento pela cooperação técnica ao longo deste trabalho e durante todo o período em que estive no laboratório.

Ao professor Tiago, sou grata pelos valiosos ensinamentos e pelas produtivas conversas que contribuíram significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico.

Não poderia deixar de agradecer ao laboratório de virologia pelo apoio essencial no sequenciamento genético, fator fundamental para a condução deste estudo. E também quero mencionar meus amigos, Victor e Leo, que estão sempre presentes pelos corredores da FAMERP e na minha vida fora dela, proporcionando momentos de descontração e suporte emocional.

À CAPES, expresso minha sincera gratidão pelo apoio financeiro concedido, bem como à FAMERP, instituição da qual tenho a honra de ser aluna.

Por fim, agradeço de coração a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração desta tese. Suas colaborações foram fundamentais para o alcance desta conquista em minha trajetória acadêmica.

“O que você faz, faz a diferença, e você tem que decidir que tipo de diferença você quer fazer.”
Jane Goodall

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das bactérias coisoladas com <i>A. baumannii</i>	33
Figura 2. Dendrograma obtido a partir da tipagem <i>Apal</i> -PFGE dos 91 isolados de <i>A. baumannii</i>	37
Figura 3. Árvore de abrangência mínima construída com base na análise de cgMLST para os isolados Ab65, Ab66, Ab111 e Ab147.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas da população estudada	28
Tabela 2. Características das amostras clínicas e culturas polimicrobianas.....	30
Tabela 3. Perfil de suscetibilidade aos antibióticos em 91 isolados de <i>A. baumannii</i>	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de oligonucleotídeos utilizados como primers para a amplificação por PCR dos genes de β -lactamase e <i>ISAbal</i>	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem, por cento
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
mg/L	Miligramas por litro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mM	Milimolar
ng/μL	Nanogramas por microlitro
μL	Microlitro
°C	Grau Celsius
pmol	picomol
V/cm	Volts por centímetro
v/v	Volume por volume
X	Vezes
β	Beta
μL	Microlitro
AIQ	Amplitude Interquartil
AK	Amicacina
AMP	Ampicilina
AmpC	Ampicillinase-Cefalosporinase
AZM	Azitromicina
BHI	Infusão cérebro-coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CAVI	Ceftazidima/Avibactam
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexos Clonal
cgMLST	<i>Core genome</i> MLST
CI	Clone Internacional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino

CLI	Clindamicina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CN	Gentamicina
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CRAB	<i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
CRO	Ceftriaxona
CTX-M	Enzima carbapenemase tipo "Cefotaximase-Munich".
DAP	Daptomicina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio Padrão
EARS-Net	Rede Europeia de Vigilância de Resistência Antimicrobiana
ECOFF	Cut-off epidemiológico
EDTA	Ácido etilenodamino tetra-acético
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
ETP	Ertapenem,
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
FEP	Cefepima
GES	Enzima carbapenemase tipo "Guiana extended-spectrum"
h	Horas
I	Sensível, aumentando exposição
ICS	Infecções da Corrente Sanguínea
IMI	Imipenem
IMP	Metalobetalactamase tipo Imipenemase
IRASs	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	Sequencia de Inserção
ISC	Infecções do Sítio Cirúrgico

ITU-AC	Infecções do Trato Urinário Associadas a Cateter
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LB	Luria-Bertani
LEV	Levofloxacino
LZD	Linezolida
Mb	Megabase
MBL	Metallo- β -lactamases da classe B
MDR	Microrganismos Resistentes a Múltiplas Drogas
MER	Meropenem
MFS	Bombas da superfamília de facilitadores principais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NDM	New Delhi metalobetalactamase
OD	Densidade Óptica
OMP	Proteína de Membrana Externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina ou Oxacilinase
PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
pb	Par de base
PB	Polimixina B
PBPs	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEN	Penicilina
PER	<i>Pseudomonas extended resistance</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTZ	Piperacilina/tazobactam
R	Resistente
RIF	Rifampicina
RND	Bombas de resistência-nodulação e divisão celular

rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	PCR em Tempo Real -Transcriptase Reversa
S	Sensível
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus-2</i>
SHV	Enzima carbapenemase tipo " <i>Sulphydryl variable</i> "
SIM	São Paulo Imipenemase
SMR	Bomba de baixa resistência a múltiplas drogas
SPM	São Paulo metalo-beta-lactamase
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprima
TBE	Tris Borato EDTA
TEI	Teicoplanina
TEM	Enzima carbapenemase tipo "Temoneira"
TIG	Tigeciclina
TSA	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
TSB	Caldo Triptona-Soja
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
VEB	<i>Vietnam extended-spectrum β-lactamase</i>
VIM	Verona Imipenemase
VM	Ventilação Mecânica
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
XDR	Extensivamente resistentes a drogas

RESUMO

Introdução: *Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista hospitalar de relevância significativa e um dos microrganismos mais resistentes presentes em instituições hospitalares em todo o mundo. No entanto, a caracterização de isolados causadores de infecção em pacientes com COVID-19 ainda não foi totalmente explorada. **Objetivo:** Nesse contexto, o propósito central deste estudo consistiu em caracterizar fenotípica e molecularmente isolados de *A. baumannii* que estavam causando infecção em pacientes com COVID-19. **Material e Método:** Foram analisadas as amostras clínicas de indivíduos com resultados positivos para COVID-19, admitidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto, durante o período de maio a outubro de 2020. Os isolados bacterianos foram submetidos à identificação de espécies e avaliação de susceptibilidade antimicrobiana por meio do sistema automatizado de microbiologia BD Phoenix™. Os isolados foram então submetidos à análise de PCR dos genes de resistência, tipagem molecular e teste de formação de biofilme. Adicionalmente, realizou-se o sequenciamento do genoma completo em quatro isolados representativos. Concomitantemente, procedeu-se à revisão retrospectiva dos prontuários médicos de todos os pacientes. **Resultados:** Um total de 91 isolados foi recuperado de 86 pacientes, sendo que 78 (85,7%) destes originaram-se de amostras de aspirado traqueal, 8 (8,79%) de urina, 4 (4,39%) de sangue e um (1%) de fluido pleural. Destaque para o fato de que a grande maioria dos pacientes (86,04%) apresentava comorbidades e 99% necessitaram de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), resultando em uma taxa de letalidade de 63,95%. Todos os isolados manifestaram o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) e demonstraram alta frequência de resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e beta-lactâmicos, enquanto apresentaram susceptibilidade à polimixina B. Em todos os pacientes, foram identificadas cepas produtoras de OXA-23. A análise de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) revelou a circulação de diferentes clones de *A. baumannii* entre os pacientes, onde 65,92% das cepas foram agrupadas em cinco clusters principais. Adicionalmente, observou-se a presença e persistência dos clones ao longo dos seis meses de investigação. A tipagem *multilocus sequence typing* (MLST) identificou quatro *sequence types* distintos (STs): ST1 (56,04%), ST15 (37,36%), ST730 (5,49%) e ST79 (1,09%). Além disso, 78 (85,71%) dos isolados

foram classificados como produtores de biofilme. A análise do *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST) evidenciou uma notável proximidade genética entre as três cepas do ST1 sequenciadas. A análise de sequenciamento completo do genoma (WGS) também evidenciou uma ampla gama de genes associados à resistência e virulência, incluindo múltiplos genes de bombas de efluxo que desempenham papéis importantes em ambas as características. **Conclusões:** Identificamos uma ampla disseminação de *A. baumannii* carreador do gene *bla*_{OXA-23}, exibindo o fenótipo de multirresistência. As linhagens ST1, ST15 e ST730 predominaram, com isolados semelhantes ao longo do tempo. A formação de biofilme foi observada na maioria dos isolados. A população analisada apresentou um perfil majoritariamente classificado como de alto risco, associada a uma alta ocorrência de óbitos. Destaca-se, portanto, a necessidade de estratégias direcionadas para mitigar a morbidade e mortalidade decorrentes de infecções secundárias, particularmente no contexto pós-pandêmico de COVID-19, com o intuito de prevenir desafios subsequentes e assegurar a segurança dos pacientes.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; COVID-19; Tipagem Molecular; Resistência.

ABSTRACT

Introduction: *Acinetobacter baumannii* is a clinically relevant hospital opportunistic pathogen and one of the most resistant microorganisms found in healthcare settings worldwide. However, the characterization of isolates causing infection in COVID-19 patients remains incompletely explored. **Objective:** In this context, the central purpose of this study was to characterize phenotypically and molecularly isolates of *A. baumannii* causing infection in patients with COVID-19. **Material and Method:** Clinical samples from individuals with positive COVID-19 results, admitted to the Hospital de Base de São José do Rio Preto, from May to October 2020, were analyzed. Bacterial isolates underwent species identification and antimicrobial susceptibility evaluation using the automated BD Phoenix™ microbiology system. The isolates were then subjected to PCR analysis of resistance genes, molecular typing, and biofilm formation testing. Additionally, whole genome sequencing (WGS) was performed on four representative isolates. Simultaneously, a retrospective review of medical records for all patients was conducted. **Results:** A total of 91 isolates were recovered from 86 patients, with 78 (85.7%) originating from tracheal aspirate samples, 8 (8.79%) from urine, 4 (4.39%) from blood, and one (1%) from pleural fluid. Notably, the majority of patients (86.04%) presented comorbidities, and 99% required Intensive Care Unit (ICU) admission, resulting in a lethality rate of 63.95%. All isolates exhibited a multidrug-resistant (MDR) phenotype and demonstrated high frequency resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams, while remaining susceptible to polymyxin B. OXA-23-producing strains were identified in all patients. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis revealed the circulation of distinct *A. baumannii* clones among patients, with 66% of strains clustered into five main groups. Furthermore, the presence and persistence of clones were observed over a six-month investigation period. Multilocus Sequence Typing (MLST) identified four distinct sequence types (STs): ST1 (56.04%), ST15 (37.36%), ST730 (5.49%), and ST79 (1.09%). Additionally, 78 (85.71%) isolates were classified as biofilm producers. Core genome MLST (cgMLST) analysis demonstrated remarkable genetic proximity among the three sequenced ST1 strains. Whole Genome Sequencing (WGS) also revealed a wide range of genes associated with resistance and virulence, including multiple efflux

pump genes that play crucial roles in both characteristics. **Conclusions:** This study identified widespread dissemination of *A. baumannii* carrying the *bla*_{OXA-23} gene, exhibiting a multidrug-resistant phenotype. The ST1, ST15, and ST730 lineages predominated, with similar isolates observed over time. Biofilm formation was observed in the majority of isolates. The analyzed population displayed a predominantly high-risk profile, associated with a high occurrence of fatalities. Therefore, there is a highlighted need for targeted strategies to mitigate morbidity and mortality resulting from secondary infections, particularly in the post-COVID-19 pandemic context, aiming to prevent subsequent challenges and ensure patient safety.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; COVID-19; Molecular Typing; Resistance.

1 INTRODUÇÃO

A doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 conhecida como COVID-19, teve início em 2019 e alastrou-se rapidamente pelo mundo, acarretando em 767.518.723 casos confirmados e 6.947.192 óbitos relatados globalmente. No Brasil, foram registrados 37.656.050 casos confirmados e 703.719 mortes, representando aproximadamente 10,12% do total de óbitos por COVID-19 no cenário mundial.¹ A falta de coordenação governamental adequada no país levou a testagens insuficientes, rápida propagação do vírus e colapso no sistema de saúde, resultando em impactos severos, incluindo um aumento significativo nas taxas de hospitalização e mortalidade entre os pacientes afetados.² Pacientes que necessitaram de internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e Ventilação Mecânica (VM) enfrentaram um maior risco de infecções secundárias e outras complicações devido à gravidade da doença e à imunossupressão associada.³ Nesse contexto, o *Acinetobacter baumannii* destacou-se como uma das bactérias mais frequentemente associadas a infecções secundárias em pacientes com COVID-19 durante a pandemia.⁴

A. baumannii é uma bactéria Gram-negativa, reconhecida entre os principais agentes de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e surtos de infecção em hospitais de todo o mundo, sendo identificada como agente de pneumonias, infecções de corrente sanguínea, infecções do trato urinário e infecções em queimados. Sua alta prevalência em ambientes hospitalares, especialmente em UTIs, é facilitada pela capacidade de formação de biofilme, resistência à dessecação, condições extremas de pH e resistência a desinfetantes comuns⁵. Essas características, associadas à notável habilidade em desenvolver resistência a múltiplos antimicrobianos, especialmente carbapenêmicos, têm motivado investigações sobre sua associação com infecções secundárias em pacientes gravemente enfermos.⁶

Ademais, *A. baumannii* é classificado como membro do grupo ESKAPE, que inclui outras cinco espécies (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp). Essas espécies são reconhecidas pelo significativo envolvimento em infecções, resistência

aos antimicrobianos, e por exibem uma variedade de fatores de virulência.⁷ Nesse contexto, *A. baumannii* também foi designada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre os patógenos resistentes prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Tal classificação se deve ao alarmante surgimento e disseminação de linhagens de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.⁸

A produção de carbapenemases é a principal causa de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Notavelmente, as carbapenemases mais prevalentes nesta espécie são OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like e OXA-51-like.⁹ *A. baumannii* exibe uma propensão para a disseminação clonal. Ao longo das últimas cinco décadas, a trajetória evolutiva de *A. baumannii* tem sido significativamente influenciada por dois clones amplamente disseminados, frequentemente referidos como clones internacionais (ou “international clones” - ICs). Esses ICs, especialmente o IC1 e o IC2, representam riscos substanciais em relação a IRAS e surtos de infecção em hospitais.¹⁰

Este estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *A. baumannii* obtidos de pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital de Base de São José do Rio Preto. Nossa análise se concentrou no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, nos determinantes genéticos de carbapenemases e 16S rRNA metiltransferases, na relação genética dos isolados, na capacidade de produção de biofilme e nos fatores genéticos relacionados à resistência e virulência de *A. baumannii* por meio do Sequenciamento Completo do Genoma. Além disso, examinamos as características clínicas dos pacientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COVID-19 e Infecções Secundárias

A COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) é uma doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus - 2*). Foi detectada pela primeira vez em dezembro de 2019, em Wuhan, na China. Em 30 de

janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma emergência de saúde pública internacional. Em 11 de março de 2020, foi classificada como uma pandemia global.¹¹ Até o primeiro semestre de 2023, foram registrados no mundo 768 milhões de casos confirmados da doença, resultando em um total de 6 milhões de mortes. No Brasil, o número de casos confirmados atingiu 37 milhões, com 704 mil óbitos.¹

Durante a pandemia, uma quantidade significativa de casos de infecção por SARS-CoV-2 foi assintomática ou apresentou sintomas leves no trato respiratório superior. No entanto, uma proporção importante dos infectados evoluiu para a forma grave da doença, conhecida como síndrome respiratória aguda grave (SRAG), o que resultou em hospitalização, admissão em unidades de terapia intensiva (UTI) e a necessidade de ventilação mecânica.¹² Estimativas indicam que cerca de 8% de todos os infectados tiveram essa evolução, mas a taxa chegou a 20% em indivíduos de alto risco, como aqueles com imunossupressão subjacente, diabetes e neoplasias. Além disso, entre os pacientes submetidos à ventilação mecânica, a taxa de mortalidade atingiu 50%.¹³

No início da pandemia, tornou-se evidente que tanto coinfeções bacterianas quanto infecções secundárias eram comuns em pacientes com COVID-19.^{3,14} Vale destacar que coinfeções são infecções bacterianas agudas que ocorrem simultaneamente com a infecção por SARS-CoV-2 e podem ser identificadas assim que os pacientes entram no hospital. Infecções secundárias, por outro lado, surgem durante o curso da doença ou da internação hospitalar.¹⁵ Westblade e colaboradores (2021)¹⁶, em um estudo de revisão, observaram que as coinfeções bacterianas estavam presentes em menos de 4% dos pacientes na admissão hospitalar. Contudo, durante a permanência hospitalar, as IRAS ocorreram em 3,7 - 21,9% dos pacientes. Quando foram avaliados apenas pacientes em UTI, a frequência aumentou para 38 a 47,5%. Estima-se que 50% dos pacientes que morreram de COVID-19 desenvolveram IRAS causadas por bactérias.^{17,18}

De fato, durante a pandemia, a incidência de IRAS aumentou significativamente.¹⁹ Esse aumento pode ser explicado pelo rápido aumento da capacidade de atendimento das UTIs, pela complexidade dos pacientes e pelo tempo

de internação, associados à redução da atenção aos programas tradicionais de prevenção, à proporção de profissionais por paciente e à escassez de equipamentos de proteção individual (EPIs). Todos esses fatores contribuíram para o crescimento da transmissão de microrganismos entre os pacientes.²⁰

A VM, um importante fator de risco para desenvolvimento de pneumonia bacteriana, foi uma das intervenções terapêuticas mais utilizadas durante o tratamento de pacientes com COVID-19 na UTI.²¹ Assim, entre as IRAS, a PAV se destacou como uma infecção secundária importante, associada ao aumento da gravidade dos quadros clínicos, ao prolongamento do tempo de permanência, à maior mortalidade e ao aumento dos custos do tratamento nos pacientes com COVID-19, afetando principalmente os idosos com comorbidades e admitidos por longos períodos em UTI.
22-24

2.2 *Acinetobacter baumannii*

Atualmente, *A. baumannii* integra o complexo *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii*, juntamente com outras cinco espécies (*A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, *A. dijkschoorniae* e *A. calcoaceticus*). Essas espécies apresentam estreita relação e compartilham propriedades fenotípicas e bioquímicas semelhantes, o que dificulta sua distinção no nível de espécie individual. A identificação precisa dos membros clinicamente relevantes desse grupo é alcançada exclusivamente por meio de métodos moleculares. No complexo, *A. baumannii* destaca-se como a espécie clinicamente mais significativa, sendo responsável por 80% das infecções.²⁵

Acinetobacter baumannii é cocobacilo Gram-negativo, aeróbico e imóvel, considerado um dos patógenos oportunistas mais importantes. É identificado como agente de IRAS e surtos de infecção em hospitais em todo o mundo, destacando-se principalmente em casos de pneumonias, infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário e de queimaduras.⁵

Pacientes infectados são os principais reservatórios para a transmissão horizontal de *A. baumannii* nos hospitais. Além disso, o microrganismo já foi isolado de pias, torneiras, amostras de mãos de profissionais de saúde, móveis, dispositivos médicos e luvas, destacando, portanto, a importância da higienização das mãos,

limpeza e desinfecção do ambiente e dos equipamentos médicos como medidas essenciais na redução da transmissão desse patógeno. ⁴ Ainda assim, o controle de sua disseminação pode ser dificultado pela capacidade de sobreviver em ambientes hostis, resistindo à dessecação, a extremos de pH e desinfetantes comuns, o que leva a surtos de infecção de difícil controle. ⁵

As infecções por *A. baumannii* estão associadas a altas taxas de mortalidade, variando de 7,8% a 23% no ambiente intra-hospitalar e de 10% a 43% em UTI. ²⁶ Em casos de pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM), essa taxa varia de 40 a 70%, enquanto para infecção de corrente sanguínea (ICS), de 28% a 43%. ²⁷ Um estudo realizado em Londrina, estado do Paraná, mostrou que a taxa de mortalidade entre pacientes com ICS causada por *A. baumannii* MDR chegou a 81.6%. ²⁸ No mesmo município, *A. baumannii* foi o segundo microrganismo mais frequentemente associado com mortes por IRAS. ²⁹

A. baumannii é um dos patógenos com as maiores taxas de resistência a praticamente todos os agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica, sendo considerado um microrganismo crítico de prioridade 1 para desenvolvimento de novos antimicrobianos pela OMS. ⁸ Na América Latina, a sensibilidade à maioria dos antimicrobianos foi inferior a 30,9%. ³⁰ Um estudo realizado nos EUA mostrou que 60% dos isolados de *A. baumannii* foram considerados MDR, enquanto na América Latina, Oriente Médio, Turquia e Grécia, as taxas de MDR foram superiores a 90%. ³¹

Em relação aos carbapenêmicos, que são as principais opções para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas MDR, ³² destaca-se que linhagens de *A. baumannii* resistentes a esses antibióticos, conhecidas como CRAB (Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*), foram responsáveis por 13,6% de todas as IRAS em UTIs da Europa, Mediterrâneo Oriental e África. ³³ Na Polônia, é o microrganismo mais frequentemente isolado em UTIs, principalmente em pacientes com pneumonia e infecções de corrente sanguínea, com 87% dos isolados classificados como extensivamente resistentes a drogas (XDR). ³⁴ No Brasil, observou-se que 100% e 86% dos isolados apresentaram resistência ao imipenem e meropenem, respectivamente. ³²

O perfil de resistência apresentado é preocupante, pois as polimixinas representam a principal alternativa para o tratamento de infecções causadas por linhagens resistentes aos carbapenêmicos. As taxas de suscetibilidade a esses antibióticos ainda são consideravelmente elevadas, variando de 93,9% na Europa a 98,1% na América Latina. ³⁵ No entanto, o uso de polimixinas está associado à sua possível nefrotoxicidade e à emergência de resistência. ³⁶

Além das polimixinas, a tigeciclina é outra opção para tratamento. ³⁷ Porém, foi licenciada pela Food and Drug Administration (FDA) apenas para infecções abdominais e de pele, visto que a eficácia de tratamento na bacteremia e na corrente sanguínea é baixa. Também é relatado o desenvolvimento de resistência durante o tratamento. ³⁶ Além disso, não existem critérios estabelecidos pelo BrCAST/EUCAST para interpretação de testes de suscetibilidade a tigeciclina contra *Acinetobacter* spp. ³⁸

Infelizmente, poucos os estudos priorizam o desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Quase 50% dos agentes recém-aprovados (5) têm como alvo as Enterobacterales resistente aos carbapenêmicos. ³⁹

2.3 A. baumannii resistente aos carbapenêmicos (CRAB) na COVID-19

Durante a pandemia, observou-se um aumento na frequência de infecções por CRAB consequente às complicações da COVID-19. ^{4,40-42} Em um estudo conduzido na Itália, 21,9% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 desenvolveram infecções secundárias, sendo que 15,6% dessas infecções foram causadas por bacilos Gram-negativos não fermentadores, principalmente *A. baumannii*. ²⁴

Em um estudo sistemático com meta-análise realizado por Musuza et al. (2021), ⁴³ foi identificado que, entre os pacientes com infecção secundária na COVID-19, *Acinetobacter* spp. foi a bactéria mais frequentemente observada. Outro estudo realizado no Rio de Janeiro mostrou que *A. baumannii* foi o principal agente etiológico

de infecções secundárias em pacientes com COVID-19 internados na UTI, e que a multirresistência estava presente em 96% dos isolados.⁴⁴

Os surtos hospitalares relacionados a cepas clínicas de CRAB têm sido cada vez mais documentados globalmente, especialmente em UTIs.^{45,46} Durante a pandemia, esses surtos ocorreram em várias nações. Por exemplo, na Espanha, Itália e Grécia, *A. baumannii* MDR foi identificado como o principal agente causador de bacteremia em pacientes com COVID-19.⁴⁷⁻⁴⁹

O aumento da frequência dessas infecções é multifatorial, mas pode estar relacionado às altas taxas de utilização de agentes antimicrobianos em pacientes com COVID-19, mesmo com uma taxa relativamente baixa de infecção secundária ou co-infecção.⁵⁰ Surtos de *A. baumannii* durante a pandemia podem ser explicados devido à alta demanda por VM e outros dispositivos circulatórios invasivos.⁵¹

Em suma, o aumento das infecções por CRAB durante a pandemia de COVID-19 representa um desafio significativo para a saúde pública global, exigindo esforços coordenados e estratégias abrangentes para mitigar os impactos dessas infecções e garantir a segurança dos pacientes nos ambientes de saúde.

2.4 Mecanismos de Resistência aos beta-lactâmicos

O mecanismo de resistência mais comum aos carbapenêmicos em *A. baumannii* envolve a expressão de carbapenemases do tipo OXA, que têm a capacidade de hidrolisar esses antibióticos. Atualmente, os principais grupos de carbapenemases OXA nessa espécie incluem as enzimas OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like e OXA-51-like. Esta última é amplamente presente, embora possa não ser expressa e, portanto, não necessariamente associada ao fenótipo de resistência. No entanto, a presença da sequência de inserção (IS) ISAba1 "upstream" ao gene bla_{OXA-51} contribui significativamente para o aumento da atividade de hidrólise dos carbapenêmicos, atuando como um potente promotor de transcrição.⁵²

Além dos principais grupos de carbapenemases tipo OXA mencionados anteriormente, foram descobertos outros dois tipos em *A. baumannii*. O primeiro é a OXA-143, inicialmente restrita ao Brasil,⁵³ mas recentemente também encontrada no Egito,⁵⁴ Iran,⁵⁵ Honduras e EUA.⁵⁶ O segundo é a OXA-182, restrita à Coreia do Sul⁵⁷. Essas descobertas mostram a ampla disseminação e a importância da vigilância contínua das carbapenemases tipo OXA em *A. baumannii*.

Adicionalmente, metalo- β -lactamases (MBL), incluindo IMP-like, SIM-1, NDM e VIM-like, também estão associadas à resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* e associadas ao integron de classe 1.^{33,58} Integrons são elementos genéticos encontrados em algumas bactérias que funcionam como vetores de genes de resistência aos antibióticos. Eles capturam, acumulam e expressam genes de resistência, permitindo a disseminação dessas características entre diferentes espécies bacterianas. Essa habilidade de transferência de genes de resistência é um dos fatores que contribuem para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, representando um desafio significativo no tratamento de infecções.⁵⁹

A resistência aos carbapenêmicos também pode resultar de mecanismos não enzimáticos, como a redução na permeabilidade da membrana externa causada por modificações na proteína de membrana externa (OMP).⁶⁰ Isso resulta em uma difusão mais lenta de antibióticos beta-lactâmicos carregados negativamente. Além disso, a atividade das bombas de efluxo desempenha um papel importante, contribuindo para a expulsão de compostos antibacterianos do periplasma.^{61,62}

Em *A. baumannii*, as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são codificadas por genes do tipo VEB ou PER, mas também são relatadas as enzimas TEM, SHV, GES e CTX-M. A produção dessas enzimas resulta na hidrólise de cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, mas sua atividade pode ser inibida por inibidores de beta-lactamase, como o ácido clavulânico.^{36,63}

Cefalosporinase do tipo AmpC, também denominada blaADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*), pode ser identificada na maioria dos isolados de *A. baumannii* e é expressa em nível basal, não reduzindo a eficácia das cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, a introdução da sequência de inserção IS*Aba1* upstream do gene *AmpC* fornece sequências promotoras que aumentam

consideravelmente a expressão da β -lactamase, resultando em resistência às cefalosporinas de terceira geração, mas não aos carbapenêmicos.⁵²

Em resumo, *A. baumannii* apresenta uma diversidade de mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, incluindo enzimáticos e não enzimáticos, tornando a vigilância contínua essencial para enfrentar esse desafio na terapêutica de infecções.

2.5 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos, tais como gentamicina, ampicacina, tobramicina, neomicina e estreptomicina, integram uma classe de antibióticos bactericidas de amplo espectro comumente empregados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivos.⁶⁴ Esses agentes antimicrobianos são eficazes apenas contra bactérias aeróbicas, uma vez que são substâncias hidrofílicas e enfrentam dificuldades para penetrar na membrana celular bacteriana hidrofóbica. Dessa forma, a internalização dos aminoglicosídeos na célula ocorre por meio de um sistema de transporte de elétrons, parte integrante do ciclo respiratório celular.⁶⁵

Após ingressarem na célula bacteriana, esses antibióticos estabelecem uma ligação irreversível no sítio A do RNA ribossômico 16S, localizado na subunidade ribossômica menor 30S, resultando em uma alteração conformacional. Tal interação afeta o início da tradução, culminando na inibição da formação adequada do complexo de iniciação para a síntese proteica. Além disso, os aminoglicosídeos apresentam a capacidade de induzir erros na interpretação do código genético durante o processo de síntese proteica, conduzindo à incorporação de aminoácidos inadequados nas cadeias polipeptídicas em desenvolvimento. Esses efeitos combinados resultam na morte das bactérias.⁶⁶

Os isolados clínicos de *A. baumannii* têm uma propensão para adquirir resistência a antibióticos comumente prescritos, como os aminoglicosídeos. Cerca de 90% dos isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes gravemente enfermos demonstraram resistência a aminoglicosídeos em países europeus.⁶⁷

Apesar de não serem a primeira escolha em muitos contextos clínicos, os aminoglicosídeos mantêm sua importância como uma classe relevante de agentes, apresentando excelente atividade bactericida em situações em que os organismos de interesse desenvolvem resistência a outras classes de antibióticos, especialmente β -lactâmicos e fluoroquinolonas.⁶⁸

2.5.1 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS

Em *A. baumannii*, a resistência aos aminoglicosídeos é principalmente atribuída a três mecanismos: a presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), a metilação do RNA ribossômico 16S por meio das 16S rRNA metiltransferases (16S RMTase) e a captação limitada do antibiótico após a perda de permeabilidade ou a superatividade de bombas de efluxo.⁶⁹

As AMEs são classificadas em três tipos de acordo com a sua capacidade de adicionar grupos como acetila, fosfato ou adenina a diferentes partes ao redor do núcleo central do aminoglicosídeo. Essas três famílias incluem: fosfotransferase de aminoglicosídeos (APS), acetiltransferase de aminoglicosídeos (AAC) e nucleotidiltransferase de aminoglicosídeos (ANT). Essas alterações reduzem a capacidade do medicamento de se ligar ao seu alvo, resultando na perda de eficácia antibacteriana.⁶⁵

Diversas AMEs, como as variantes das fosfotransferases APH(3')-I, APH(3')-II e APH(3')-VI, as acetiltransferases AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-III, AAC(6')-I, AAC(6')-II e AAC(6')-III, e as nucleotidiltransferases ANT(3-)-I, ANT(4')-I e ANT(2'')-I, foram identificadas em *Acinetobacter* spp. Essas enzimas geralmente estão presentes em elementos transponíveis e podem ser transferidas entre bactérias patogênicas.⁷⁰

As 16S RMTases conferem um elevado nível de resistência à maioria dos aminoglicosídeos em bactérias Gram-negativas por meio da modificação de regiões específicas do rRNA, resultando na efetiva inibição da ligação dos aminoglicosídeos ao seu local-alvo. Até o momento, foram identificados globalmente dez genes de 16S RMTase (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* e *npmA*).⁶⁶ Esses genes são comumente encontrados em pequenos plasmídeos. A metilase 16S rRNA

ArmA é identificada em várias cepas de *A. baumannii*, muitas vezes coexistindo com carbapenemases do tipo OXA, como a OXA-23.³⁷

2.6 Técnicas moleculares para avaliar a relação clonal de *A. baumannii*

São várias as metodologias de tipagem molecular utilizadas para investigar a relação clonal em *A. baumannii*. Dentre elas, destacam-se: o *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Multilocus sequence typing* (MLST) e *Core genome MLST* (cgMLST). Essas ferramentas têm sido fundamentais para compreender a epidemiologia e a disseminação dessa bactéria, fornecendo informações importantes para o controle e prevenção de infecções nosocomiais.⁷¹

A PFGE é um método de tipagem molecular que se baseia na separação de fragmentos de DNA por meio de um campo elétrico. Primeiro, o DNA é digerido com uma enzima de restrição, que corta o DNA em locais específicos. Os fragmentos de DNA resultantes são então separados por tamanho usando uma matriz de gel e um campo elétrico que é periodicamente mudado de direção. Essa alternância do campo elétrico permite a separação de grandes fragmentos de DNA, os quais seriam difíceis de separar usando métodos tradicionais de eletroforese em gel. O padrão resultante de fragmentos de DNA, conhecido como impressão digital genômica, pode ser usado para comparar e diferenciar entre diferentes cepas ou isolados de um determinado organismo.⁷²

A técnica de PFGE é uma ferramenta valiosa nesse contexto, permitindo investigar a epidemiologia local, identificar surtos clonais e elucidar se a disseminação ocorre por contaminação cruzada entre pacientes ou por meio de ambientes hospitalares contaminados.⁷³

A MLST é uma técnica de tipagem molecular que visa caracterizar geneticamente as cepas bacterianas por meio do sequenciamento de fragmentos de sete genes altamente conservados, conhecidos como "*housekeeping genes*". A combinação dos alelos em cada isolado bacteriano forma um perfil único, conhecido como *Sequence Type* (ST). Isolados com STs idênticos ou muito similares são considerados geneticamente relacionados e provavelmente têm uma origem comum.

⁷⁴ Com o desenvolvimento da tipagem por MLST, tornou-se possível comparar resultados entre diferentes laboratórios, facilitando a identificação de clones de alto risco disseminados globalmente. Esse método é considerado o padrão ouro para investigar a estrutura populacional de *A. baumannii*, contribuindo significativamente para o entendimento epidemiológico e a relação entre fenótipos e genótipos dessa espécie bacteriana. ^{74,75}

A maioria das infecções e surtos hospitalares causados por *A. baumannii* MDR envolve três principais clones disseminados mundialmente, referidos como clones internacionais 1, 2 e 3 (CI 1, 2 e 3). ³⁶ Dentre esses clones, o ST2 é o mais predominante, desempenhando um papel significativo nos surtos de infecção por CRAB na Europa. ⁵

Na América Latina, os clones endêmicos incluem CC113/CC79, CC104/CC15, CC110/ST25 e CC109/CC1 correspondente ao MLST de Oxford/Pasteur, frequentemente associados à presença do gene *bla*_{OXA-23}. ⁷⁶ Um estudo abordando 11 estados brasileiros, identificou os complexos clonais CC15 (ST15), CC1 (ST1) e CC79 (ST79) como os mais prevalentes. ⁷⁷ Outro estudo focado apenas no sudeste do Brasil, também confirmou a predominância desses complexos clonais. ⁷⁸ Destaca-se que mais de 71% de todos os genomas sequenciados até o momento incluem o ST2, ST1, ST79 e ST25, enfatizando importância desses clones. ⁵

Em um estudo realizado na Suíça, foi documentado um surto por CRAB da linhagem ST2, portadores do gene *bla*_{OXA-23-like}, em pacientes com COVID-19 internados em UTIs. ⁷⁹ Da mesma forma, na Itália, foi observada a ocorrência de infecções de corrente sanguínea em pacientes internados com COVID-19 na UTI causadas por linhagens ST2 portadoras do gene *bla*_{OXA-23-like}. ⁸⁰ No Irã, isolados de CRAB pertencentes à linhagem ST2 também foram identificados carregando o mesmo gene de resistência aos carbapenêmicos. ⁸¹ Esses achados ressaltam a importância da vigilância e do controle de infecções por CRAB, especialmente quando associadas a clones específicos e portadoras do gene *bla*_{OXA-23-like}.

O cgMLST é uma técnica de tipagem molecular baseada na análise genômica. Essa abordagem se fundamenta no estudo de um conjunto de 2.390 genes centrais, identificados a partir de 1.573 genomas putativos de *A. baumannii* em isolados

representativos das oito linhagens clonais internacionais dessa espécie bacteriana. Esses genes são amplamente conhecidos como o “*core genome*” e são altamente conservados. A técnica envolve a identificação e sequenciamento de múltiplos loci de genes do *core genome* em isolados bacterianos distintos.⁸²

A análise dos polimorfismos de nucleotídeos únicos presentes nesses genes possibilita a comparação entre as linhagens, permitindo a identificação da origem de surtos e o rastreamento da disseminação de linhagens de *A. baumannii* em diferentes hospitais ou regiões.⁸² Além disso, essa abordagem tem sido útil para detectar linhagens emergentes, monitorar a prevalência de resistência aos antimicrobianos e avaliar a eficácia das medidas de controle de infecção. A padronização do esquema de tipagem facilita a troca de dados entre laboratórios, tornando-se uma ferramenta valiosa para estudos de epidemiologia molecular e para o estudo da evolução e propagação de bactérias patogênicas.^{83–85}

A obtenção de sequências genômicas completas também fornece informações cruciais para a compreensão da epidemiologia, dos mecanismos de resistência aos antibióticos e dos possíveis determinantes genéticos associados à virulência.⁵ Portanto, a realização de investigações completas é fundamental para obter conhecimentos adicionais e aprimorar a orientação e as perspectivas de pesquisa, permitindo o estabelecimento de uma vigilância epidemiológica em tempo real. Esse esforço conjunto é essencial para enfrentar o desafio crescente da resistência antimicrobiana e garantir melhores estratégias de controle e prevenção de infecções.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de Pacientes e Coleta de Dados

Este estudo foi conduzido no Hospital de Base de São José do Rio Preto, um hospital de ensino terciário com 1.102 leitos, localizado no Estado de São Paulo, Brasil, durante o período de maio a outubro de 2020. Os critérios de inclusão abrangeram pacientes admitidos com infecção confirmada pelo SARS-CoV-2, diagnosticada por meio da técnica de RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - Transcriptase Reversa), os quais também apresentaram amostras clínicas positivas para o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* obtidas por cultura, sem restrições quanto ao sítio de isolamento ou momento da admissão.

As amostras clínicas foram submetidas à cultura com base nos sintomas clínicos de infecção dos pacientes, identificados por especialistas seniores do departamento de doenças infecciosas do hospital, seguindo as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).⁸⁶ Foram considerados pacientes com suspeita de Infecção de Corrente Sanguínea/Septicemia (ICS), Infecção do Trato Urinário (ITU), Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV), Pneumonia Relacionada à Assistência à Saúde (PRAS) e Pneumonia Adquirida no Hospital (PAH). A análise abrangeu apenas culturas que apresentaram crescimento com contagem de colônias igual ou superior (\geq) a 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL) em aspirado traqueal e contagem $\geq 10^5$ UFC/mL para culturas de urina.⁸⁷ Pacientes sem suspeita de infecção por *A. baumannii* e sem confirmação laboratorial de COVID-19 foram excluídos da análise.

As informações demográficas, laboratoriais e clínicas dos pacientes incluídos neste estudo foram obtidas retrospectivamente a partir dos prontuários eletrônicos. Os dados abrangem informações como idade, sexo, tipo de amostra biológica, data da coleta, resultados das culturas, resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, presença de comorbidades, internação em UTI, terapia antimicrobiana, duração da internação, realização de intubação orotraqueal e/ou ventilação mecânica, bem como o desfecho clínico.

O estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CAAE 47241721.0.0000.5415, Anexo I). Devido à natureza retrospectiva do estudo, a obtenção do consentimento informado dos pacientes foi dispensada.

3.2 Classificação das Infecções

As IRAS por *A. baumannii* foram definidas como aquelas que ocorreram após 48 horas da admissão hospitalar e/ou se o paciente tivesse sido hospitalizado durante as 2 semanas anteriores à admissão atual. Essa abordagem foi adotada uma vez que vários pacientes foram encaminhados ao hospital após a admissão em uma Unidade de Pronto Atendimento (UPA). Infecções secundárias foram definidas como amostras clínicas positivas para *A. baumannii* obtidas ≥ 48 horas após a hospitalização por COVID-19. Os critérios diagnósticos de PAV seguiram as diretrizes da ANVISA.⁸⁶

3.3 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi empregada uma abordagem descritiva com o propósito de apresentar as medidas de número absoluto e frequência relativa (em porcentagem) das variáveis categóricas. Em relação às variáveis contínuas, foram empregadas as medidas de tendência central, como média e desvio padrão (DP), quando os dados apresentaram uma distribuição normal. Caso contrário, utilizaram-se a mediana e a amplitude interquartil (AIQ) para representar os dados. A normalidade da distribuição foi avaliada por meio do histograma no Excel e confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk realizado no software R.

3.4 Coleta dos Isolados, Identificação e Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Foram obtidos 91 isolados de *A. baumannii* de um total de 86 pacientes. A amostra incluiu 81 pacientes com isolados únicos e cinco pacientes com dois isolados. Três pacientes apresentaram isolados de diferentes sítios do corpo, enquanto dois pacientes apresentaram isolados do mesmo sítio, mas com uma diferença temporal superior a dez dias. Todos os isolados provenientes de aspirado traqueal, líquido

pleural, urina e sangue (quando os frascos de hemocultura aeróbica apresentaram resultado positivo) foram subcultivados em placas de ágar sangue, chocolate e MacConkey (Biomérieux®, França) e mantidos em condições aeróbicas a 37°C por 18-24 horas, a fim de possibilitar o isolamento bacteriano.

Posteriormente, os isolados foram identificados e submetidos a testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) por meio do sistema automatizado de microbiologia BD Phoenix™, utilizando cartões de identificação colorimétrica GN (Becton Dickinson, EUA). Após a identificação, os isolados foram encaminhados ao Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foram armazenados a -80 °C em caldo infusão de coração e cérebro (BHI; Difco) contendo 20% (v/v) de glicerol (Dinamica, Brasil) para processamento posterior.

No TSA, foram testados os seguintes antimicrobianos: Ampicilina/Sulbactam (SAM), Piperacilina/Tazobactam (PTZ), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Ceftriaxona (CRO), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amicacina (AK), Gentamicina (CN), Ciprofloxacina (CIP), Tigeciclina (TIG) e Polimixina B (PB). Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de PB, utilizou-se o sistema de microdiluição em caldo POLICIMBAC® (Probac do Brasil). A interpretação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; documento M100-S21).⁸⁸

Embora os pontos de corte interpretativos para tigeciclina contra *A. baumannii* ainda não tenham sido estabelecidos por nenhuma autoridade regulatória, utilizou-se o valor de cut-off epidemiológico (ECOFF) de 0,5 mg/L estabelecido pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁸⁹ para determinar se os isolados eram do tipo selvagem ou não. O ECOFF é definido como a medida mais elevada de CIM para os isolados sem aquisição de mecanismos de resistência (tipo selvagem), neste caso, o ECOFF é de 0,5 mg/L. Isso quer dizer que isolados com CIM menor ou igual a meio não possuem mecanismos de resistência detectados e isolados com CIM maior que 0,5 mg/L possuem algum mecanismo de resistência. Os resultados foram considerados como "tipo selvagem" se o MIC estivesse dentro da

faixa considerada como tipo selvagem, ou "não-tipo selvagem" se o MIC fosse maior que essa faixa.

A multirresistência (MDR) foi definida como a resistência a pelo menos três antimicrobianos de diferentes classes de antibióticos, excluindo a tigeciclina, como proposto por Magiorakos et al. (2012).⁹⁰

3.5 Extração de DNA e PCR para Identificação de Genes de Resistência

As cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas por meio de cultivo em caldo Luria-Bertani (LB, Oxoid) a 37 °C por 16 h. Posteriormente, o DNA foi extraído utilizando o kit illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin (GE healthcare, Reino Unido) de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado quanto à concentração e pureza utilizando um espectrofotômetro Colibri LB 915 (Berthold Technologies Bioanalytic) e ajustado para uma concentração de 100 ng/μL. O DNA foi então armazenado a -20 °C para uso futuro.

Os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA) ou no termociclador modelo T100™ (Biorad Laboratórios Brasil Ltda).

Cada reação de amplificação do DNA continha 1 μL de DNA bacteriano, 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), tampão de reação 1X e água Milli-Q (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 μL.

Foram utilizados 5 μL do produto amplificado para observação em eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™) 1,5% - 2%, preparada em 100 mL de tampão Tris Borato EDTA (TBE) a 0,5x (0,445 M Tris: 0,445 M ácido bórico: 0,01 M EDTA em pH 8). Na corrida eletroforética, foi utilizado um marcador de tamanho molecular de 100pb Ladder (Invitrogen™). Os géis foram corados com a solução de 0,8 μL de brometo de etídio (10mg/mL) e fotografados pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus Biothecnology).

3.5.1 DETECÇÃO DOS GENES DE BETA-LACTAMASES

Para detectar a presença dos genes de β -lactamase, realizou-se a técnica de PCR utilizando iniciadores específicos para amplificar as sequências dos seguintes genes: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} e *bla*_{OXA-48-like}, pertencentes à classe D de β -lactamases; *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER} e *bla*_{VEB}, pertencentes à classe A de β -lactamases; *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{NDM}, pertencentes à classe B de β -lactamases. Os iniciadores e os protocolos de PCR utilizados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Lista de oligonucleotídeos utilizados como primers para a amplificação por PCR dos genes de β -lactamase e IS*AbaI*.

Gene Alvo	Sequência do Primer (5' → 3')	Tamanho do produto (bp)	Referência
β-lactamases Classe D (OXA)			
<i>bla</i> _{OXA-51}	F-TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	
	R-TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>bla</i> _{OXA-23}	F-GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	91
	R-ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>bla</i> _{OXA-24}	F-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	
	R-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>bla</i> _{OXA-58}	F-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	
	R-CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>bla</i> _{OXA-143}	F-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	92
	R-TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>bla</i> _{OXA-48}	F-GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	93
	R-CATCAAGTTCAACCCAACCG		
β-lactamases Classe A			
<i>bla</i> _{KPC}	F-TGTCACTGTATCGCCGTC	1009	94
	R-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>bla</i> _{GES}	F-AGTCGGCTAGACCGGAAG	399	95

Gene Alvo	Sequência do Primer (5' → 3')	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>bla</i> _{VEB}	R-TTTGTCCGTGCTCAGGAT	648	
	F-CATTTCCCGATGCAAAGCGT		
<i>bla</i> _{PER}	R-CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	520	
	F-GCTCCGATAATGAAAGCGT		
β-lactamases Classe B			
<i>bla</i> _{IMP}	F-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	587	96
	R-GTATGTTTCAAGAGTGATGC		
<i>bla</i> _{VIM}	F-GTTTGGTCGCATATCGCAAC	389	
	R-AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>bla</i> _{SPM}	F-CTGCTTGGATTCATGGGCGC	784	97
	R-CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
<i>bla</i> _{NDM}	F-GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	93
	R-GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT		
Sequência de inserção			
IS <i>AbaI</i>	F-CACGAATGCAGAAGTTG	-	98
	CGACGAATACTATGACAC		
F= <i>forward primer</i> , R= <i>reverse primer</i> , pb = par de base.			

3.5.2 SEQUÊNCIA DE INSERÇÃO IS*AbaI*

Para investigar a presença da sequência de inserção IS*AbaI* "*upstream*" dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, foi realizada uma técnica de PCR utilizando o primer *forward* IS*AbaI* em combinação com o primer *reverse* *bla*_{OXA-51} ou o primer *reverse* *bla*_{OXA-23} (ver Quadro 1). A PCR foi conduzida de acordo com o protocolo descrito anteriormente por Segal et al (2005),⁹⁸ utilizando a combinação de primers descrita por Turton et al (2006).⁹⁹ A PCR consistiu em uma reação de 25 µL de volume final, com os seguintes reagentes: 2,5 µL de solução tamponante 10× com KCl; 0,5 mM de cada um dos quatro dNTP; 1 µM de cada primer; 1,5 mM de solução de MgCl₂; 50 ng

de DNA genômico; 1 U de Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific) e água ultrapura q.s.p 25 µL. O programa de amplificação utilizado foi: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 3 minutos, com extensão final a 72 °C por 7 minutos. As amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, com brometo de etídio a 0,8%, sob a voltagem de 6 V/cm por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 1 kb (ThermoFisher Scientific). O resultado foi observado e fotografado como descrito no subitem 3.5.

3.5.3 16S rRNA METILTRANSFERASES

A presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos que codificam 16S rRNA metiltransferases incluindo *armA*, *npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, e *rmtH* foi investigada em isolados previamente caracterizados como resistentes aos aminoglicosídeos, de acordo com a metodologia descrita por Corrêa et al. (2014).

100

A PCR foi realizada em duas multiplex. Na primeira, foram utilizados primers direcionados aos genes *rmtA* (F, 5' - AA ACTATTCCGCATGGTTC-3' /R, 5' - TCATGTACACAAGCTCTTTCC-3'; 88 bp), *rmtC* (F, 5' -CAGGGGTTCCAACAAGT-3' /R, 5' -AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA-3'; 246 bp), *rmtD* (F, 5' -TCGTTTCAGCACGTAACA-3' /R, 5' -CAGCGCGAAATTCAAAAAGG-3'; 652 bp), *rmtG* (F, 5' -ACGGAATGCCGCGGAAGTA-3' /R, 5' -TCTCCGCAAGCAGATCGCCG-3'; 381 bp) e *rmtH* (F, 5' -ATGACCATTGAACAGGCAGC-3' /R, 5' -AGGGCAAAGGTAAAATCCCA-3'; 464 bp). Já na segunda multiplex, os primers foram direcionados aos genes *armA* (F, 5' -ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC3' /R, 5' -ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3'; 101 bp), *npmA* (F, 5' -GGGCTATCTAATGTGGTG-3' /R, 5' -TTTTTATTTCCGCTTCTTCGT-3'; 229 bp), *rmtB* (F, 5' -ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3' /R, 5' -AAGTATATAAGTTCTGTTCCG-3'; 171 bp), *rmtE* (F, 5' -GATGCCGTGTCTGTTACGCCG3' /R, 5' -ACGTGAACCCACGAGTCCTGC-3'; 446 bp) e *rmtF* (F, 5' -CGATCCTACTGGGCTCCAT-3' /R, 5' -GGCATAGTGCTTTTCCATGC3'; 314 bp).

Os parâmetros de ciclagem foram os mesmos para ambas as reações multiplex e consistiram em desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguida de 25 ciclos de 94 °C por 45 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 25 s, e uma etapa final de extensão a 72 °C por 3 min. As condições da reação de PCR e a visualização dos fragmentos foram conduzidas conforme descrito no subitem 3.5

3.6 Tipagem Molecular

3.6.1 PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

A similaridade genética dos isolados de *A. baumannii* foi investigada utilizando o PFGE conforme descrito previamente por Seifert et al. (2005),⁷² com algumas modificações.

3.6.1.1 PREPARAÇÃO DOS PLUGS (LISE DE CÉLULAS E LAVAGEM)

Os isolados foram cultivados em ágar BHI por 18 horas a 37 °C. A partir desses cultivos, células de cada isolado foram utilizadas para o preparo de suspensões bacterianas em 2 mL de NaCl 0,9% estéril. O ajuste da concentração celular das suspensões foi realizado no espectrômetro Colibri (Titertek-Berthold) a 600 nm, com densidade óptica entre 0,8 a 1,2. Em seguida, 100 µL de cada suspensão ajustada foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. Após remover toda a fase líquida, as células foram suspensas em 50 µL de tampão de suspensão celular (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH final igual a 8). A essa suspensão celular, foram adicionados 50 µL de agarose CleanCut 2% (BioRad) a 54 °C. Após uma breve homogeneização, todo o volume foi distribuído em moldes de confecção de plugs. Os plugs foram solidificados em temperatura ambiente e, em seguida, transferidos para 500 µL de tampão de lise (50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH final igual a 8), contendo 1% de lauril sarcosinato de sódio e 0,1 mg/mL de proteinase K.

Posteriormente, foram incubados a 54 °C por 20 horas para permitir a lise das células no plug de agarose. Após a lise das células, os plugs foram submetidos a dez lavagens, com intervalos de 25 minutos entre cada uma delas. As duas primeiras lavagens foram realizadas com água Milli-Q a 54 °C, enquanto as demais foram feitas com TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH final da solução igual a 8), mantendo-se a

mesma temperatura. Após a lavagem, os plugs foram armazenados a 4°C até a etapa de digestão do DNA.

3.6.1.2 DIGESTÃO DE RESTRIÇÃO (FRAGMENTAÇÃO DO DNA)

Um pedaço de cada plug (4,0 por 5,5 mm) foi cortado com um bisturi e transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 100 µl de tampão de restrição fornecido com a enzima, contendo 10 U da enzima de restrição *Apal* (Thermo Scientific, EUA). Os tubos foram agitados suavemente, e os plugs foram incubados a 37°C por 24 h. O tampão de restrição foi removido de cada tubo e substituído por 200 µl de 0,5× TBE (10× TBE 0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico e 20 mM EDTA, pH 8,3). Se os plugs não fossem utilizados no mesmo dia, eram mantidos durante a noite ou por alguns dias a 4°C.

3.6.1.3 A ELETROFORESE DO DNA FRAGMENTADO

Após serem deixados em temperatura ambiente por 5 minutos, os pedaços de cada plug foram cuidadosamente posicionados sobre os dentes do pente, seguindo uma ordem pré determinada. Para determinar os tamanhos dos fragmentos de DNA, foi utilizado o marcador ProMega-Markers® Lambda Ladders (Promega), que foi disposto quatro vezes ao longo do pente com o objetivo de normalizar os padrões eletroforéticos em todo o gel.

Previamente, eram preparados 150 mL de agarose a 1,5% (Sigma Aldrich) em TBE a 0.5x, dos quais cerca de 6 mL destinavam-se a fixação dos pedaços de plug e marcadores nos dentes do pente. Isso era feito pela solidificação de 200 uL de agarose depositadas sobre os referidos pedaços. Após a fixação dos pedaços ao pente, a próxima etapa envolvia verter todo o restante da agarose em molde apropriado, seguido da acomodação do pente no molde. Após completa solidificação da agarose, o pente era retirado e o molde desmontado, disponibilizando o gel de agarose para ser submetido a eletroforese de campo pulsado. O equipamento utilizado foi o PFGE CHEF-DR® II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) sob as seguintes condições: tampão TBE 0,5x, temperatura de 14°C, voltagem de 6 V/cm, um "switch" inicial de 5 segundos e um "switch" final de 35 segundos, por um período de 19 horas.

O resultado da eletroforese foi visualizado e fotografado usando o fotodocumentador LPix Ex (Loccus, Brasil).

3.6.1.4 ANÁLISE DOS PADRÕES DE BANDAS

A análise dos padrões de bandas foi realizada utilizando o software BioNumerics™ versão 7.6 (Applied Maths). O coeficiente de similaridade de Dice foi empregado para calcular a similaridade entre os padrões de bandas. O dendrograma foi construído por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), com uma tolerância de posição de banda de 1,0%. Os isolados com um coeficiente de similaridade de $\geq 90\%$ foram considerados como pertencentes ao mesmo cluster.

3.6.2 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

O esquema de tipagem por MLST foi utilizado com base na análise das sequências das porções internas de sete genes *housekeeping*, conforme descrito anteriormente por Diancourt et al. (2010).¹⁰¹ Os genes alvo incluíram *cpn60* (quinase de glicose), *fusA* (fator de alongação EF-G), *gltA* (citrato sintase), *pyrG* (CTP sintase), *recA* (fator de recombinação homólogo), *rplB* (proteína ribossomal 50S L2) e *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase).

Após a amplificação dos genes por PCR, os produtos foram submetidos a um procedimento de purificação utilizando precipitação com etanol. O "amplicon" foi inicialmente transferido para um microtubo de 1,5 mL previamente identificado, ao qual foi adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3 M e três vezes o volume de etanol absoluto (Merck Chemicals). Os microtubos foram então incubados em um freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora para precipitar o DNA. Após a incubação, foram centrifugados a 16.000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, ao precipitado foi adicionado três vezes o volume de etanol 70% (Merck Chemicals) e novamente centrifugado por 20 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi descartado e, após a completa secagem do etanol, o DNA purificado foi suspenso em 20 μL de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8.0) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As sequências foram obtidas utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Para as reações de sequenciamento, foram utilizados 1 μL do tampão

de sequenciamento 5x, 1 µL de primer (0,4 µM) *forward* ou *reverse*, 1 µL de Big Dye, 2 µL do produto de PCR purificado e 5 µL de água ultrapura q.s.p para completar um volume final de 10 µL. A ciclagem foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida por 25 ciclos compostos por desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. Em seguida, as reações a serem sequenciadas foram purificadas por precipitação com etanol e EDTA, seguindo o protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001).¹⁰²

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, utilizando o Analisador Automático de DNA modelo Applied Biosystems 3130 (Applied Biosystems-HITACHI). A análise das sequências foi realizada utilizando o software Accelrys DS Gene 2.0. Os STs (Sequence Types) dos isolados foram determinados com base nas sequências de alelos disponíveis no website do Instituto Pasteur (https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_abaumannii_seqdef).¹⁰³

3.7 Sequenciamento completo do genoma (*Whole-Genome Shotgun/ WGS*)

Quatro isolados representativos (Ab65, 66, 111 e 147) foram submetidos ao sequenciamento genético completo. O DNA total foi extraído utilizando o kit "bacteria GenomicPrep Mini Spin Kit" (GE Healthcare®) seguindo as recomendações do fabricante. Bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando o Illumina DNA Prep (Illumina, Inc.) conforme instruções do fabricante. A quantificação das bibliotecas foi realizada utilizando o Qubit® dsDNA HS em um instrumento fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). O controle de qualidade foi avaliado utilizando o sistema TapeStation 4150 com o kit High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Inc.), seguido de agrupamento em concentrações equimolares. O sequenciamento do genoma rascunho "*draft genome*" foi realizado pela plataforma MiSeq™ Illumina.

O sequenciamento envolveu o uso do kit miSeq Reagent v3 (300 ciclos) para obtenção de leituras emparelhadas de 2 × 150 pb. O kit NextSeq PhiX Control foi utilizado para normalização do sequenciamento. A avaliação da qualidade, filtragem das leituras e montagem *de novo* do genoma foram conduzidas utilizando as ferramentas FastQC v0.11.5, Trimmomatic v0.39 e SPAdes v3.14.0, disponíveis na plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

3.7.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DAS SEQUÊNCIAS DE “*DRAFT GENOME*”

Os perfis de cgMLST e a tipagem de MLST baseada no esquema Pasteur/Oxford foram determinados utilizando o PubMLST.¹⁰³ Uma árvore de abrangência mínima de perfis alélicos de cgMLST foi construída utilizando o Grapetree no BacWGSTdb 2.0.¹⁰⁴ Os dados obtidos, em formato de arquivo FASTA, foram analisados para determinar o resistoma dos isolados utilizando o VRProfile2,¹⁰⁵ ResFinder 4.1¹⁰⁶ e MobileElementFinder v1.0.3,¹⁰⁷ acessados através do Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>). O PlasmidFinder 2.1¹⁰⁸ (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) e o ISfinder 1.0¹⁰⁹ (<https://www-is.biotoul.fr/>) foram utilizados para identificar os tipos de replicon de plasmídeos e elementos de sequência de inserção (IS), respectivamente. A análise do viruloma foi conduzida utilizando o banco de dados Virulence Factors Database (VFDB)¹¹⁰ (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFalyzer>).

As sequências foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob o bioprojeto PRJNA1003529, com as seguintes identificações: SAMN36892636 (Ab65), SAMN36892637 (Ab66), SAMN36892638 (Ab111) e SAMN36892639 (Ab147).

3.8 Formação de Biofilme

A habilidade dos isolados em formar biofilme foi avaliada por meio do ensaio em placas de poliestireno utilizando o método de coloração com cristal violeta, conforme descrito anteriormente por Hassan et al. (2011).¹¹¹ Em resumo, as bactérias foram isoladas a partir de placas de ágar MacConkey e inoculadas em 3 mL de Caldo Tripton-Soja (TSB, Sigma Aldrich). As culturas foram incubadas a 37 °C por 18 horas para promover o crescimento bacteriano. Após a incubação, as culturas foram então diluídas 1:100 com meio fresco. Utilizando placas estéreis de cultura de tecido de fundo plano de poliestireno de 96 poços (Sigma-Aldrich), foram adicionados 200 µL das culturas bacterianas diluídas em cada poço individual. Controles negativos também foram preparados seguindo o mesmo procedimento, com poços de controle negativo contendo caldo estéril. As placas de cultura foram incubadas a 37 °C por 24 horas para permitir a formação de biofilme nas superfícies dos poços. Após a

incubação, o conteúdo de cada poço foi cuidadosamente removido por batidas suaves para eliminar as bactérias flutuantes e não aderentes. Os poços foram lavados quatro vezes com 0,2 mL de Tampão fosfato-salino (pH 7.2) para remover qualquer resíduo não aderente. O biofilme formado pelas bactérias aderentes aos poços foi fixado utilizando metanol 96% (Êxodo Científica) por 20min e corado com cristal violeta (0,1%). O excesso de corante foi removido utilizando água deionizada, e as placas foram deixadas secar à temperatura ambiente. A densidade óptica (OD) do biofilme aderente e corado foi medida utilizando o equipamento de leitura de ELISA Spectramax Plus® (Molecular Devices) a um comprimento de onda de 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

A produção de biofilme foi avaliada seguindo os critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2007).¹¹² O valor de corte da densidade óptica (ODc) foi determinado como a média da densidade óptica (OD) do controle negativo adicionada de três desvios padrão (DP), utilizando a fórmula: $ODc = \text{média da OD do controle negativo} + (3 \times DP \text{ do controle negativo})$. Os resultados foram categorizados em quatro grupos com base nos valores de OD: (1) forte produtor de biofilme ($4 \times ODc < OD$); (2) produtor moderado de biofilme ($2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$); (3) produtor fraco de biofilme ($ODc < OD \leq 2 \times ODc$); e (4) não produtor de biofilme ($OD \leq ODc$).

4 RESULTADOS

4.1 Características dos Pacientes

Entre maio e outubro de 2020; 86 pacientes hospitalizados com COVID-19 foram diagnosticados com infecção nosocomial secundária causada por *A. baumannii*. Dentre eles, 81 (94,18%) receberam o diagnóstico após pelo menos 48 horas de internação, com uma média de 9 dias entre a admissão hospitalar e o diagnóstico da infecção. Os outros 5 pacientes (5,81%) foram diagnosticados no primeiro dia de internação, mas inicialmente buscaram atendimento em unidades de pronto atendimento públicas antes de serem encaminhados ao hospital. Quatro desses pacientes foram admitidos na mesma unidade de emergência. A maioria dos pacientes (63%) eram do sexo masculino, com idade média de 63,5 anos (DP=13,81).

A maioria dos pacientes (86,04%) apresentava comorbidades, com uma média de 2 comorbidades por paciente. As comorbidades mais frequentemente relatadas foram hipertensão arterial sistêmica (59,30%) e diabetes (43,02%). O tempo médio de internação foi de 26 dias, e praticamente todos os pacientes (99%) necessitaram de ventilação mecânica invasiva, intubação orotraqueal e internação em UTI. A taxa de letalidade foi de 63,95%. Todos os pacientes receberam pelo menos um antibiótico, sendo que 51 (59,30%) receberam ceftriaxona e/ou azitromicina como terapia empírica, e 39 (45,34%) já haviam sido tratados com carbapenêmicos antes do isolamento de *A. baumannii*. Após o diagnóstico de infecção por *A. baumannii*, 59 pacientes (68,60%) receberam terapia subsequente com polimixina E e 10 (11,62%) com polimixina B.

Dos 86 pacientes avaliados, 39 (45,34%) apresentaram culturas monomicrobianas, nas quais somente *A. baumannii* foi identificado. Dentre esses pacientes, 27 (69,23%) vieram a óbito. Desse total, 10 (37,03%) foram atribuídas a septicemia, 8 (29,63%) à infecção por coronavírus, 7 (25,92%) a choque não especificado e 2 (7,40%) a choque séptico. Importante ressaltar que entre os pacientes com infecções monomicrobianas que vieram a óbito, complicações associadas à PAV foram confirmadas em 7 (17,94%) pacientes, sendo que 2 (28,57%) destes também apresentavam focos urinários.

A Tabela 1 apresenta as características clínicas e demográficas da população estudada.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas da população estudada

Características		Pacientes n= 86
Idade, anos, média (DP)		63.5 (13.81)
Gênero, masculino, n (%)		54 (62.79)
Presença de comorbidades, n (%)		74 (86.04)
Número de comorbidades, mediana (AIQ)		2 (2)
Comorbidades, n (%)	Hipertensão Arterial Sistêmica	51 (59.30)
	Diabetes	37 (43.02)
	Obesidade	23 (26.74)
	Doença Cardiovascular ^a	20 (23.25)
	Dislipidemia	8 (9.30)
	Hipotireoidismo	8 (9.30)
	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	4 (4.65)
	Doença Renal Crônica	5 (5.81)
	Distúrbios Psiquiátricos	7 (8.13)
	Câncer	3 (3.48)
Tempo de permanência no hospital, dias, mediana (AIQ)		26 (16,75)
Tempo de permanência na UTI, dias, mediana (AIQ)		23 (13)
Ala de admissão, n (%)	UTI	85 (99)
Ventilação Mecânica, n (%)		85 (99)

Características	Pacientes n= 86
Intubação orotraqueal, n (%)	85 (99)
Traqueostomia, n (%)	32 (37,20)
Hospitalização antes da infecção, dias, mediana (AIQ)	9 (8,75)
Mortes, n (%)	55 (63,95)
Mortes em infecção polimicrobiana, n (%)	31 (59,57%)
Mortes em infecção monomicrobiana, n (%)	25 (69,23%)
Antibiótico usado antes da infecção por Ab, n (%)	
Ceftriaxona	48 (55,81)
Vancomicina	46 (53,48)
Azitromicina	45 (52,32)
Meropenem	39 (45,34)
Piperacillina/Tazobactam	37 (43,02)
Antibiótico usado depois da infecção por Ab, n (%)	
Polimixina E (Colistina)	59 (68,60)
Vancomicina	48 (55,81)
Meropenem	24 (27,90)
Amicacina	18 (20,93)
Levofloxacino	13 (15,11)
Polimixina B	10 (11,62)
Piperacillina/Tazobactam	6 (6,97)
Linezolida	5 (5,81)

n, número; %, porcentagem; DP, desvio padrão; AIQ, Amplitude Interquartil; UTI, Unidade de Terapia Intensiva. ^a Doença Cardiovascular inclui Doença Arterial Coronariana, Arritmia

Cardíaca, Insuficiência Cardíaca, Trombose Venosa Profunda e Acidente Vascular Cerebral. Ab, *A. baumannii*.

4.2 Características das Culturas

A maioria dos isolados foram recuperados de aspirado traqueal (85,7%, n = 78), seguido por urina (8,79%, n = 8), sangue (4,39%, n = 4) e líquido pleural (1%, n = 1) (Tabela 2). Culturas polimicrobianas foram identificadas em 50 amostras (54,94%), totalizando 62 microrganismos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (16/25,80%), *Staphylococcus aureus* (16/25,80%), *Klebsiella pneumoniae* (11/17,74%), *Enterococcus faecalis* (5/8,06%), *Escherichia coli* (2/3,22%), *Klebsiella oxytoca* (2/3,22%), *Staphylococcus epidermidis* (2/3,22%), *Stenotrophomonas maltophilia* (2/3,22%), *Candida albicans* (2/3,22%), *Candida* spp. (1/1,61%), *Enterobacter cloacae* (1/1,61%), *Klebsiella aerogenes* (1/1,61%) e *Staphylococcus haemolyticus* (1/1,61%).

A susceptibilidade aos antibióticos foi avaliada em todos os isolados que foram identificados em associação com *A. baumannii*. Entre os 16 isolados de *P. aeruginosa*, 14 (87,5%) apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados, enquanto 2 (12,5%) apresentaram resistência a cefepima, ceftazidima e piperacilina/tazobactam. Entre os 11 isolados de *K. pneumoniae*, 6 (54,54%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem), no entanto, todos foram suscetíveis à amicacina. Dos 16 isolados de *S. aureus*, todos exibiram sensibilidade à gentamicina, linezolida, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina e vancomicina. No entanto, quatro (25%) desses isolados demonstraram resistência concomitantemente à oxacilina, ciprofloxacino, levofloxacino, azitromicina e clindamicina. Todos eram resistentes a azitromicina e 15 (93,75%) eram resistentes a clindamicina.

Informações adicionais sobre os antibióticos testados e outros resultados de susceptibilidade podem ser encontrados na Figura 1.

Tabela 2. Características das amostras clínicas e culturas polimicrobianas.

Características	Isolados n=91
Amostras Clínicas, n (%)	
Aspirado Traqueal	78 (85,71)
Urina	8 (8,79)
Sangue	4 (4,39)

Fluído Pleural		1 (1,09)
Culturas Polimicrobianas, n (%)		50 (54,94)
Aspirado Traqueal		
	<i>P. aeruginosa</i>	11 (22%)
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>	3 (6%)
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>E. cloacae</i>	1 (2%)
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>E. coli</i>	1 (2%)
	<i>K. pneumoniae</i>	3 (6%)
	<i>K. pneumoniae</i> + <i>S. aureus</i>	3 (6%)
	<i>S. aureus</i>	13 (26%)
	<i>E. faecalis</i>	2 (4%)
	<i>E. faecalis</i> + <i>S. epidermidis</i>	1 (2%)
	<i>E. faecalis</i> + <i>S. maltophilia</i>	1 (2%)
	<i>C. albicans</i>	2 (4%)
	<i>K. oxytoca</i>	1 (2%)
	<i>K. oxytoca</i> + <i>S. maltophilia</i>	1 (2%)
	<i>E. coli</i>	1 (2%)
	<i>K. aerogenes</i>	1 (2%)
	<i>S. epidermidis</i>	1 (2%)
Urina		
	<i>Candida ssp.</i>	1 (2%)
	<i>K. pneumoniae</i>	1 (2%)
Sangue		
	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. faecalis</i>	1 (2%)
Fluído Pleural		
	<i>S. haemolyticus</i>	1 (2%)

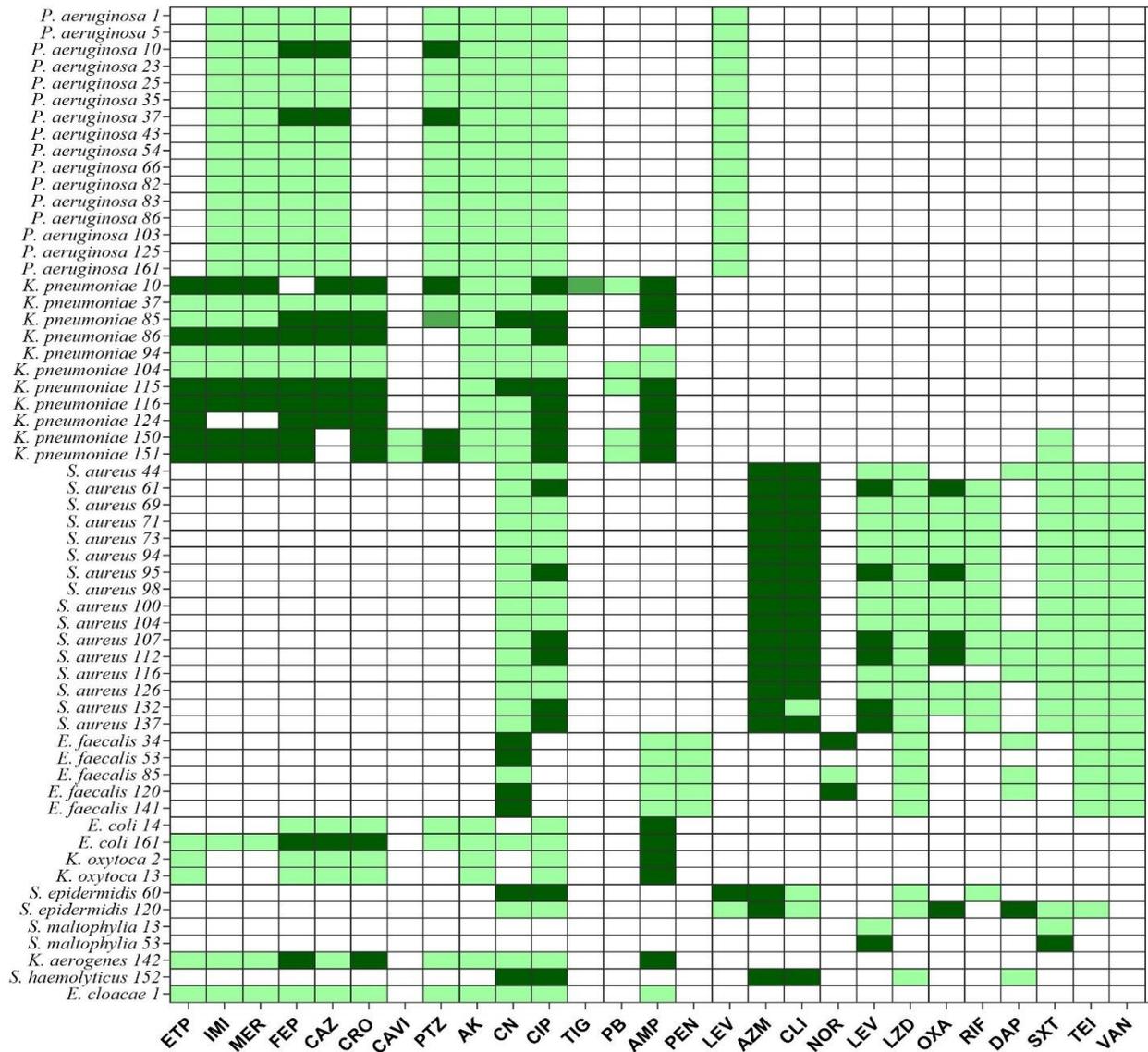
n, número; %, porcentagem.

4.3 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Todos os 91 isolados de *A. baumannii* (100%) apresentaram o fenótipo de multirresistência (MDR), com resistência a meropenem, imipenem, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, ceftriaxona e ciprofloxacino. A resistência à gentamicina foi detectada em 90 isolados (98,9%), e à amicacina em 71 (78,02%). Entre os 71 isolados testados para Ampicilina/Sulbactam, 58 (81,69%) apresentaram resistência. Todos os isolados testados foram classificados como tipo

não selvagem para tigeciclina, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) acima do limite de corte (ECOFF) de 0,5 mg/L. Entre os 85 isolados testados, 16 (18,82%) apresentaram CIM de 2 mg/L, 63 (74,11%) exibiram CIM de 4 mg/L, e 6 (7,05%) tiveram CIM > 4 mg/L. A polimixina B foi o único antibiótico ao qual todos os isolados mostraram suscetibilidade (Tabela 3).

Figura 1. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das bactérias isoladas em associação com *A. baumannii*.



P. aeruginosa, *Pseudomonas aeruginosa*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *K. oxytoca*, *Klebsiella oxytoca*; *S. epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*; *S. maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*; *K. aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*; *S. haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*; *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; Macrolídeos: AZM – Azitromicina; Lincosamidas: CLI – Clindamicina; Fluoroquinolonas: CIP – Ciprofloxacino, LEV – Levofloxacino; Aminoglicosídeos: AK – Amicacina, CN – Gentamicina; Oxazolidinonas: LZD – Linezolid; Rifamicinas: RIF – Rifampicina; Lipopeptídeos: DAP – Daptomicina; Sulfonamidas: SXT – Sulfametoxazol/Trimetoprima; Glicopeptídeos: TEI – Teicoplanina, VAN – Vancomicina; Carbapenêmicos: ETP – Ertapenem, IMI – Imipenem, MER – Meropenem; Cefalosporina de quarta geração: FEP – Cefepima; Cefalosporina de terceira geração com inibidor de beta-lactamase: CAVI – Ceftazidima/Avibactam; Cefalosporina de terceira geração: CAZ – Ceftazidima, CRO – Ceftriaxona; Penicilina de amplo espectro com inibidor de beta-lactamase: PTZ – Piperacilina/tazobactam; Penicilinas: AMP – Ampicilina, PEN – Penicilina, OXA – Oxacilina; Tetraciclina: TIG – Tigeciclina; Polimixina: PB – Polimixina B; Verde claro: Sensível (S); Verde moderado: Intermediário (I); Verde escuro: Resistente (R).

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade aos antibióticos em 91 isolados de *A. baumannii*

Antibióticos	Nº de isolados testados	Nº de isolados não testados	S (%)	I (%)	R (%)	CIM > 0.5 mg/L
Antibióticos beta-lactâmicos/inibidores enzimáticos						
Ampicilina/Sulbactam (SAM)	71	20	1 (1,4)	12 (16,9)	58 (81,69)	-
Piperacilina/Tazobactam (PTZ)	91	0	0	0	91 (100)	-
Cefalosporinas						
Ceftazidima (CAZ)	91	0	0	0	91 (100)	-
Cefepima (FEP)	91	0	0	0	91 (100)	-
Ceftriaxona (CRO)	53	38	0	0	53 (100)	-
Carbapenêmicos						
Imipenem (IPM)	91	0	0	0	91 (100)	-
Meropenem (MER)	91	0	0	0	91 (100)	-
Aminoglicosídeos						
Amicacina (AK)	91	0	4 (4.39)	16 (17.58)	71 (78.02)	-
Gentamicina (CN)	91	0	1 (1.09)	0	90 (98.9)	-
Fluoroquinolonas						
Ciprofloxacino (CIP)	91	0	0	0	91 (100)	-
Tetraciclinas						

Antibióticos	Nº de isolados testados	Nº de isolados não testados	S (%)	I (%)	R (%)	CIM > 0.5 mg/L
Tigeciclina (TIG)	85	6	-	-	-	85 (100)
Polimixina						
Polimixina B (PB)	91	0	91 (100)	0	0	-

n, número; %, porcentagem; S, Suscetível; I, suscetível, Intermediário; R, Resistente; CIM, Concentração Inibitória Mínima.

4.4 Genes de Resistência

Todos os isolados apresentaram os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}. Além disso, não foram detectados outros genes determinantes para a produção de carbapenemases. Nas reações de PCR utilizando primers ISAbal-OXA-23-like, houve a amplificação de um fragmento em todos os isolados, indicando a presença do gene OXA-23 com a sequência de inserção ISAbal localizada à montante dele. Já na PCR utilizando primers ISAbal-OXA-51-like, foi obtido um fragmento em 19 (20,87%) dos isolados. Adicionalmente, nenhum dos isolados foi encontrado portando 16S rRNA metiltransferases.

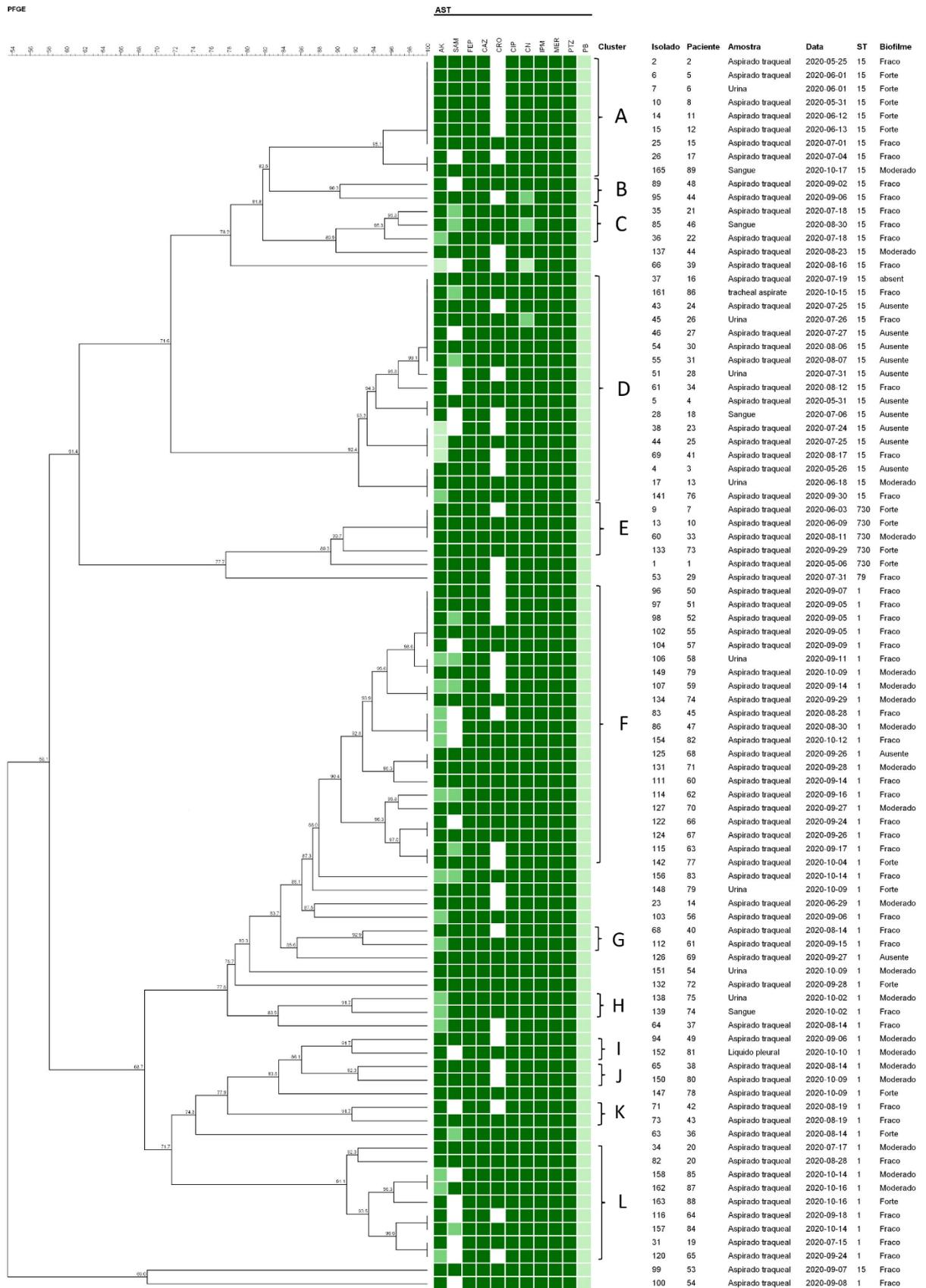
4.5 Tipagem Molecular

A técnica de PFGE revelou uma diversidade de pulso-tipos entre os 91 isolados de *A. baumannii* analisados. Esses isolados foram classificados em 28 pulso-tipos diferentes. Dentre eles, apenas 16 (17,58%) não apresentaram agrupamentos com outros isolados e mostraram perfis genéticos distintos dos demais. A maior parte dos isolados, ou seja, 75 (82,41%), foi distribuída nos 12 pulso-tipos restantes, sugerindo a ocorrência de similaridade genética.

Clusters incluindo múltiplos isolados foram nomeados de A a L. Os clusters F, D, A, L e E foram os que incluíram maior número de isolados, correspondendo a 23,07% (n = 21), 18,68% (n = 17), 9,89% (n = 9), 9,89% (n = 9) e 4,39% (n = 4) dos isolados, respectivamente. Totalizando 65,92% dos isolados. O dendrograma que ilustra esses resultados está apresentado na Figura 2.

Além disso, o PFGE também demonstrou que 19 (20,87%) isolados nos quais foi detectada a presença do elemento genético ISAbal a montante do gene *bla*_{OXA-51}, 17 (89,47%) pertenciam ao mesmo pulso-tipo (cluster D). Os outros dois isolados (Ab66 e 137) não foram agrupados com nenhum outro isolado, mas estavam acima desse cluster no dendrograma, sugerindo uma relação genética próxima.

Figura 2. Dendrograma obtido a partir da tipagem *Apal*-PFGE dos 91 isolados de *A. baumannii*.



O dendrograma foi construído usando Otimização 0% e Tolerância 1%. AK, amicacina; SAM, ampicilina-sulbactam; FEP, cefepima; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; CIP, ciprofloxacino; CN, gentamicina; IPM, imipenem; MER, meropenem; PTZ, piperacilina-tazobactam; PB, polimixina B; Perfil de Suscetibilidade a Antimicrobianos: Quadrados em verde escuro, resistência; Verde médio, intermediário; Verde claro, suscetibilidade; Branco, não testado.

Com base na análise de MLST, foi observada uma menor diversidade genética em comparação ao PFGE. Foram identificados quatro STs distintos, sendo eles ST1, ST15, ST730 e ST79, representando 56,04% (n = 51), 37,36% (n = 34), 5,49% (n = 5) e 1,09% (n = 1) dos isolados, respectivamente. Todos os isolados pertencentes ao mesmo cluster de PFGE compartilharam o mesmo ST. Isso indica uma relação clonal e confirmação das análises realizadas, uma vez que todos os isolados do mesmo cluster de PFGE compartilharam o mesmo ST. A maioria dos isolados ST15 foi agrupada em quatro clusters (A-D), enquanto a maioria dos isolados ST1 foi agrupada em sete clusters (F-L). Também foi observada a presença de isolados com padrões de bandas idênticos (Figura 2).

4.6 Formação de Biofilme

Dos 91 isolados de *A. baumannii*, 78 (85,71%) foram considerados produtores de biofilme. Dentre esses, 43 (55,12%) foram classificados como produtores de biofilme fraco, 20 (25,64%) moderado e 15 (19,23%) forte.

4.7 Análise de WGS (Whole Genome Sequencing)

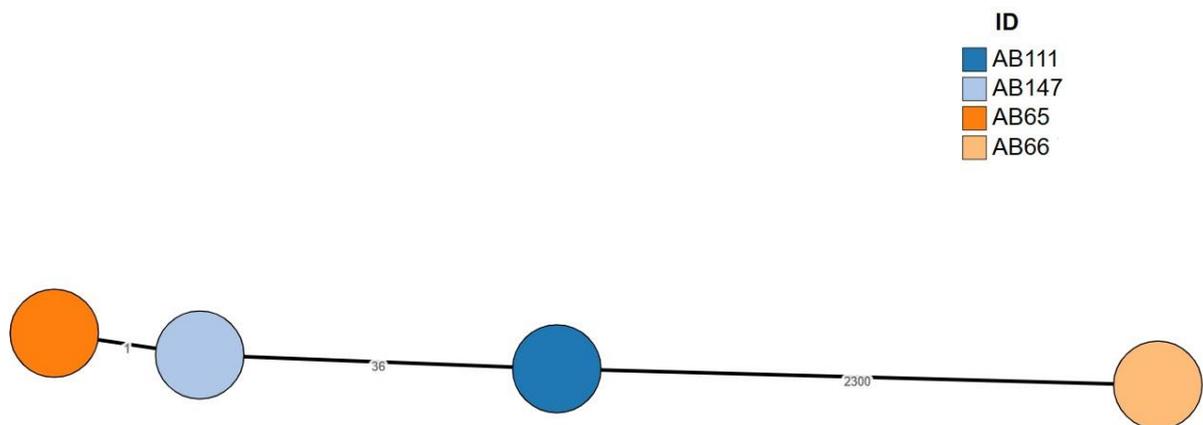
As análises genômicas revelaram que o tamanho médio do genoma é de 3,8 Mb, com uma média de 53,5 contigs. Além disso, todos os isolados apresentaram um conteúdo G+C médio de 39,05%. Um resumo das características dos genomas sequenciados de *A. baumannii* (Ab65, Ab111, Ab147 e Ab66) é apresentado no Apêndice A.

Utilizando o PubMLST, confirmamos que o isolado Ab66 pertence ao ST15 de acordo com o esquema de Pasteur (^{Pas}) e ST236 de acordo com o esquema de Oxford. Já os isolados Ab65, Ab111 e Ab147 foram identificadas como ST1^{Pas}. No entanto, no esquema de Oxford, esses isolados foram classificados como ST231 ou ST1604.

Essa discrepância na classificação ocorreu devido a sequências duplicadas de *gdhB*, um problema conhecido no esquema de MLST de Oxford (Apêndice B).

Em relação à análise de cgMLST, três isolados ST1^{Pas} (Ab65, Ab111 e Ab147) compartilharam o mesmo cgST851, enquanto o isolado Ab66- ST15^{Pas} foi identificado como cgST801. No entanto, foram identificadas variações em tipos específicos de alelos nos loci de cgMLST. O isolado Ab65 apresentou um alelo diferente em comparação com Ab147, e ambos exibiram 36 alelos diferentes em comparação com Ab111 (Figura 3). Notavelmente, Ab66 demonstrou um perfil genético distinto dos demais, diferindo em 2300 alelos, conforme revelado pela análise de sequência de 2390 genes-alvo de cgMLST. Isso indica uma maior diversidade genética e possível evolução independente de Ab66 em relação aos outros isolados.

Figura 3. Árvore de abrangência mínima construída com base na análise de cgMLST para os isolados Ab65, Ab66, Ab111 e Ab147.



Os números nas linhas ilustram o número de diferenças alélicas entre os isolados. A árvore filogenética foi gerada e visualizada utilizando o Grapetree no BacWGSTdb (<http://bacdb.cn/BacWGSTdb/>).

Foram identificados genes determinantes de resistência a classes específicas de antibióticos. Todos os isolados carregam os mesmos genes de β -lactamases, especificamente *bla*_{OXA-23} e *bla*_{ADC-25} (*AmpC*). Nos três isolados ST1, foi detectado o alelo *bla*_{OXA-69}, uma variante do gene *bla*_{OXA-51-like} que é intrínseco, enquanto ST15 apresentou o alelo *bla*_{OXA-51}. Esses genes de β -lactamase estão localizados no cromossomo.

Adicionalmente, foram encontrados outros genes de resistência, incluindo determinantes de resistência aos aminoglicosídeos (*aph(3')-Ia*, *ant(3'')-IIc*, *aadA*, *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ib*) e de resistência a sulfonamidas *sul1*. Notavelmente, genes que codificam três famílias de bombas de efluxo clinicamente relevantes foram identificados: bombas de resistência-nodulação e divisão celular (RND) (*adeABCRS*, *adeFGHL*, *adelJK*), bomba de baixa resistência a múltiplas drogas (SMR) (*abeS*) e bombas da superfamília de facilitadores principais (MFS) (*AmvA*, *AbaF*, *AbaQ*, *qacEΔ1*, *cmIB1*). Essas bombas de efluxo contribuem para a resistência contra múltiplos antibióticos. Além disso, a cepa Ab66 carregava os genes *mph(E)* e *msr(E)*, que conferem resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B. Também foram observadas mutações em *gyrA* (S81L) e *parC* (S84L, V104I, D105E), que podem conferir resistência ao inibir a ligação de fluoroquinolonas às enzimas DNA girase e topoisomerase. O Apêndice C apresenta uma lista abrangente dos genes de resistência identificados.

ISAbal e ISAb33 foram identificados em todos os quatro isolados, e Tn6018 foi detectado no mesmo contig dos genes *aadA1*, *qacE*, *aac(3)-Ia* e *sul1* nos isolados Ab65, Ab111 e Ab147. Não foram encontrados plasmídeos específicos; no entanto, de acordo com a análise do VRProfile, esses genes estão associados a um plasmídeo nos isolados Ab65 e Ab147.

A presença de genes de virulência específicos do Banco de Dados de Fatores de Virulência de *Acinetobacter* (VFDB) foi investigada. Os resultados estão apresentados no Apêndice D, evidenciando que todos os quatro isolados compartilham os mesmos genes. Vários fatores associados à formação de biofilme em *A. baumannii* foram identificados, incluindo o sistema de montagem de pili usher-chaperone *CsuA/BABCDE*, o sistema de dois componentes *BfmS/BfmR*, a proteína de membrana externa *OmpA*, a proteína associada ao biofilme (*bap*) e o complexo de proteínas *PgaABCD* necessárias para a síntese de poli-beta-1-6-N-acetilglucosamina (PNAG). Além disso, o cluster de genes *Acinetobactin* e o gene *hemO*, envolvidos na captação de ferro, foram encontrados em todas os isolados. Foram detectados genes que codificam as enzimas fosfolipases C e D, o sistema de percepção de quorum *abal/abaR* e o gene associado à resistência ao soro *PbpG*.

5 DISCUSSÃO

O atual cenário da saúde pública, marcado pela pandemia de COVID-19, trouxe à tona preocupações crescentes acerca das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e da resistência bacteriana aos antibióticos. Durante a pandemia, observou-se que pacientes com COVID-19 grave, principalmente os admitidos em UTI, eram vulneráveis a infecções bacterianas secundárias, que resultavam em complicações importantes e aumento da mortalidade. Além disso, a VM, um procedimento terapêutico comumente realizado nas UTIs durante o tratamento da COVID-19, é a principal causa de pneumonia adquirida no hospital, ampliando, dessa forma, o risco de infecções bacterianas.^{3,21,33}

Considerando-se que durante a pandemia de COVID-19, poucos estudos no Brasil se dedicaram a investigar infecções bacterianas secundárias¹¹³, iniciamos esse estudo, visando descrever as características clínicas de pacientes com COVID-19 assistidos no HB que desenvolveram infecção secundária por *A. baumannii*. Além disso, procuramos caracterizar os isolados quanto ao seu perfil de suscetibilidade a antibióticos, aos determinantes de resistência aos carbapenêmicos e à sua relação clonal. A escolha por estudar essa espécie baseia-se no fato de ser uma das bactérias mais frequentemente isoladas em pacientes com COVID-19, sendo responsável por diversos surtos de infecção durante a pandemia em vários países, incluindo o Brasil, México, Estados Unidos, Japão⁴, Suíça⁷⁹ e Espanha.⁴⁷ Além disso, relatos indicam um aumento significativo na incidência de infecções por *A. baumannii* multirresistentes durante a pandemia de COVID-19 em comparação com o período pré-pandêmico¹¹⁴.

A. baumannii foi identificado como o principal patógeno responsável por infecções respiratórias e na corrente sanguínea em pacientes com COVID-19.^{115,116} No Brasil, um estudo realizado em cinco UTIs no estado do Rio de Janeiro, revelou um aumento significativo nessas infecções durante a pandemia, atingindo o pico em junho de 2020, quando o Brasil se tornou o epicentro da COVID-19.⁵¹ Da mesma forma, Istambul, Turquia, também experimentou taxas elevadas em 2021¹¹⁴. Análises recentes da Rede Europeia de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (EARS-Net) sugerem que os países da União Europeia, onde mais de 50% dos isolados de *Acinetobacter* spp. já eram resistentes a carbapenêmicos antes da pandemia de

COVID-19, enfrentaram desafios significativos no controle da disseminação desse patógeno durante a pandemia. ¹¹⁷

Quase a totalidade dos pacientes (99%) com COVID-19 e infecção secundária por *A. baumannii* incluídos neste estudo encontrava-se internada em UTI e sob VM. De fato, o trato respiratório inferior figura como um dos sítios mais frequentemente acometidos por infecções secundárias em pacientes com COVID-19 grave. ¹¹⁸ A presença de comorbidades foi uma característica preponderante, sendo observada na maioria dos pacientes, com destaque para a combinação de HAS, obesidade e diabetes, que é descrita no contexto brasileiro como as comorbidades mais prevalente entre pacientes com COVID-19. ¹¹⁹

Além disso, a presença dessas comorbidades tem demonstrado uma associação substancial com o desenvolvimento de formas graves da doença. Essas condições comórbidas têm sido correlacionadas com alterações adversas na resposta imunológica, a promoção de estados inflamatórios crônicos. Isso, por sua vez, intensifica a resposta inflamatória ao vírus SARS-CoV-2. ¹²⁰ A elevada taxa de letalidade observada nesses pacientes está em consonância com outros relatos que associaram infecções secundárias ao aumento do risco de óbito. ^{12,121,122} Especificamente, surtos de IRAS causados por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos em UTIs são reconhecidos como um fator de risco significativo que contribui para o aumento da mortalidade. ^{5,123,124}

Todos os isolados de *A. baumannii* incluídos neste estudo foram identificados como MDR, apresentando resistência aos principais antibióticos recomendados para o tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas, tais como cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos e fluoroquinolonas, sendo sensíveis apenas às polimixinas. Pesquisas realizadas na América Latina, incluindo o Brasil, demonstraram que isolados de *A. baumannii* com esse perfil de multirresistência são comuns nessa região. ^{28,30,32,125} Isso representa um desafio significativo, uma vez que a terapia com polimixinas está associada à nefrotoxicidade e ao desenvolvimento de resistência. ³³ Quanto à tigeciclina, um antibiótico frequentemente utilizado em combinação com a colistina, ¹²⁶ sua eficácia é limitada no

tratamento de bacteremias e infecções na corrente sanguínea, havendo relatos de desenvolvimento de resistência durante o tratamento.⁵⁸

A maior parte dos isolados de *A. baumannii* foi recuperada de culturas polimicrobianas, ou seja, em associação com outros microrganismos. De fato, *A. baumannii* é frequentemente encontrado em infecções polimicrobianas.¹²⁷⁻¹²⁹ No entanto, existe uma hipótese que considera *A. baumannii* como verdadeiro agente apenas em infecções monomicrobianas, enquanto seu isolamento a partir de culturas polimicrobianas pode representar colonização. Os outros microrganismos, geralmente mais suscetíveis aos antimicrobianos e com maior probabilidade de serem sensíveis aos antibióticos usados na terapia empírica, provavelmente representam o verdadeiro patógeno causador da infecção. Isso pode resultar em maior falha no tratamento quando as infecções são causadas apenas por *A. baumannii* multirresistente.^{128,130} Essa hipótese foi confirmada por Karakonstantis e Kritsotakis (2021)¹³¹, que identificaram menor mortalidade associada a infecções polimicrobianas envolvendo *A. baumannii* em comparação com infecções monomicrobianas. Em nosso estudo, a letalidade em infecções polimicrobianas foi de 59,57%, enquanto em infecções monomicrobianas foi de 69,23%.

S. aureus, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram as espécies mais frequentemente encontradas em associação com *A. baumannii*. Essas bactérias são importantes agentes de PAV¹³², e sua presença em associação com *A. baumannii* em pneumonias polimicrobianas já foi relatada.^{133,134} A maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* apresentou sensibilidade a antibióticos clinicamente importantes, como piperacilina/tazobactam, ceftazidima e cefepima, e todos foram sensíveis ao meropenem. Em relação ao *S. aureus*, quatro isolados foram identificados como MRSA (“*meticillin resistant S. aureus*”), no entanto, todos os isolados demonstraram sensibilidade a agentes comumente utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, como linezolida e vancomicina. Além disso, é importante notar que, entre os 11 isolados de *K. pneumoniae* encontrados, uma parcela significativa (54,54%) apresentou resistência aos carbapenêmicos. Esses resultados corroboram a hipótese discutida anteriormente, destacando a necessidade crucial de uma gestão adequada do uso de antimicrobianos e a implementação de

abordagens de tratamento personalizadas, que levem em consideração a complexidade das infecções e a importância de diagnósticos precisos.¹³⁵

Em todos os isolados deste estudo, foram identificados os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}. O gene *bla*_{OXA-51-like}, que codifica uma beta-lactamase que confere resistência a benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina e piperacilina, é intrínseco e localizado no cromossomo de *A. baumannii*.¹³⁶ Por outro lado, o gene *bla*_{OXA-23-like} é amplamente reconhecido como um importante determinante adquirido de resistência aos carbapenêmicos.⁹ A presença da sequência de inserção *ISAba1*, identificada a montante do gene *bla*_{OXA-23-like} em todos os isolados, determina a superexpressão desse gene codificador de carbapenemase.⁵² No entanto, em relação ao gene *bla*_{OXA-51-like}, a ocorrência dessa associação foi observada apenas em alguns isolados. O gene *bla*_{OXA-51-like} confere resistência aos carbapenêmicos somente quando associado a elementos de inserção tipo *ISAba1* ou *ISAba9*, localizados upstream ao gene, agindo como forte promotor transcricional.⁹⁹

A tipagem molecular por PFGE revelou uma diversidade de perfis genéticos entre os isolados, que foram organizados em 12 *clusters* (agrupamentos) distintos. Em alguns desses *clusters*, foram identificados isolados idênticos, ou seja, que compartilhavam 100% de similaridade com pelo menos um isolado proveniente de pacientes diferentes. Isso indica claramente a transmissão de *A. baumannii* entre pacientes durante o período de estudo. É notável que linhagens idênticas tenham sido isoladas de amostras coletadas de pacientes diferentes, em datas espaçadas entre 94 a 145 dias, o que destaca a capacidade dessas linhagens de persistir no ambiente hospitalar. Adicionalmente, observou-se o isolamento de *A. baumannii* com perfis genéticos distintos em quatro pacientes (44, 54, 74 e 79) evidenciando que os pacientes podem ser infectados por diferentes linhagens ao longo de sua permanência hospitalar.

Além disso, identificamos dois pacientes com isolados obtidos do aspirado traqueal em momentos distintos. O paciente 20 apresentou dois isolados altamente correlacionados, coletados com um intervalo de 42 dias entre si, evidenciando uma infecção de longa duração. Já o paciente 44 teve isolados diferentes coletados com

um intervalo de 14 dias entre eles, sendo um desses isolados associado a um isolado de outro paciente (cluster B).

Durante a pandemia, o aumento da capacidade de leitos, impulsionado pela disseminação generalizada do SARS-CoV-2, dificultou o isolamento dos pacientes como estratégia preventiva para o controle de infecções. Além disso, a priorização da autoproteção dos profissionais de saúde contra infecções virais inevitavelmente comprometeu a adesão aos protocolos padronizados para a manipulação de pacientes.¹³⁷ *A. baumannii* é uma espécie reconhecida pela habilidade de permanecer por períodos prolongados no ambiente hospitalar devido à sua capacidade de formação de biofilme em diferentes materiais, conferindo alta resistência à dessecação. Essa característica permite a colonização de equipamentos médicos, como tubos endotraqueais ou cateteres venosos centrais, aumentando assim a sua persistência e facilitando a transmissão entre pacientes.^{123,138} Estudos recentes também demonstraram que *A. baumannii* produtores de biofilme são comumente isolados em UTIs.^{139,140}

Em relação à tipagem por MLST, os isolados identificados como ST15 agruparam-se nos *clusters* A a D, ST730 no cluster E e ST1 nos clusters F a L. ST1 e ST15, que são os mais prevalentes neste estudo, pertencem ao clone internacional I (CI-1) e ao complexo clonal 15 (CC15). Esses STs, juntamente com o ST79 (CC79), têm sido identificados como os principais clones de *A. baumannii* produtores de OXA-23 mais disseminados em hospitais brasileiros.^{77,141} Embora tenha sido identificado apenas um isolado de *A. baumannii* ST79 neste estudo, é interessante observar que cinco isolados de ST730 foram identificados. O ST730 representa uma variação de apenas um locus em relação ao clone de alto risco ST79, que é responsável pela disseminação de OXA-23 na América Latina. Esse resultado sugere a possível persistência do ST730 em hospitais brasileiros desde sua primeira detecção em 2014.

142

A análise de MLST desempenhou um papel importante ao mostrar que os clones ST1 e ST15, que já circulavam no Brasil antes da pandemia, foram os mesmos detectados em nossa instituição durante o período pandêmico. Embora os STs prevalentes possam variar entre diferentes regiões geográficas, a persistência de

clones relevantes é uma característica comum em várias localidades. No entanto, é importante enfatizar que novos clones com potencial para se estabelecer e se tornarem endêmicos podem emergir. Por exemplo, isolados do clone internacional II (CI-2), amplamente disseminado em várias regiões do mundo, mas pouco comum no Brasil e na América Latina ^{45,79,81,143,144}, foram introduzidos em um hospital no estado de São Paulo. Isso resultou em um surto significativo de infecções durante a primeira onda de COVID-19 no Brasil. ¹¹³

É notável que os ST25 e ST113, que fazem parte do CC113 e também estão presentes no Brasil ⁷⁸, não tenham sido identificados em nosso estudo. Embora existam poucos estudos sobre a relação clonal de isolados de *A. baumannii* de pacientes com COVID-19, nossos resultados estão de acordo com outros estudos que relataram uma transmissão clonal significativa intra-hospitalar de linhagens endêmicas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. ^{79,145–147}

A análise do genoma completo de quatro isolados mostrou a presença de genes que codificam resistência contra aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, cloranfenicol e fluoroquinolonas, bem como os genes que codificam as carbapenemases OXA-23 e OXA-51. No entanto, a análise das sequências não permitiu identificar a posição exata de IS_{Abal} nos isolados, como ocorreu com o uso da técnica de PCR. Essa dificuldade pode ser atribuída aos desafios causados pela presença de sequências de inserção durante o processo de montagem do genoma. Durante as etapas iniciais da montagem, os elementos IS, encontrados em várias cópias, são frequentemente agrupados em um único contig, representando a sequência completa do elemento IS. Os contigs são fragmentados nas localizações dos elementos IS, e as sequências de leituras que abrangem a junção entre a sequência cromossômica e as sequências IS se estendem por algumas poucas bases na sequência. Como resultado, a identificação das extremidades do elemento IS nas montagens de genoma acaba sendo desafiadora. ¹⁴⁸

A presença de genes que codificam diferentes bombas de efluxo provavelmente está associada à resistência a múltiplas drogas observada nesses isolados. Por exemplo, os transportadores MFS, tais como AmvA, AbaF e AbaQ, afetam a suscetibilidade a antibióticos específicos como eritromicina, fosfomicina e

quinolona, respectivamente, e também contribuem para a expulsão de corantes e desinfetantes, como clorexidina e cloreto de benzalcônio.^{149–151} O gene *AbeS*, membro da família SMR, desempenha um papel secundário na redução da suscetibilidade a diversos antibióticos, além de estar envolvido na resistência a corantes e detergentes.¹²³

A bomba de efluxo AdeABC, pertencente à família RND, é responsável por expulsar aminoglicosídeos, trimetoprima, cloranfenicol, fluoroquinolonas e tetraciclina. A proteína AdeRS regula a expressão de genes relacionados à formação de biofilme e à motilidade.⁶⁹ A superexpressão da proteína AdeFGH resulta em uma redução na suscetibilidade a múltiplos antibióticos, enquanto a proteína AdeIJK, que é a única bomba de efluxo RND encontrada em todos os quatro isolados de *A. baumannii* sequenciados e também a única encontrada em todas as cepas de *A. baumannii* até o momento, desempenha um papel fundamental na resistência intrínseca. Isso inclui resistência a uma ampla variedade de classes de antibióticos, como β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, MLS (Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas), fenicóis, antifolatos e ácido fusídico. Além disso, a proteína AdeIJK demonstra sinergia com a proteína AdeABC em algumas situações de resistência a antibióticos específicos, como tetraciclina, minociclina e tigeciclina.^{123,152}

Apesar da capacidade limitada de formação de biofilme, os quatro isolados exibiram uma diversidade de genes associados a esse processo. Os genes responsáveis pelo sistema de montagem Usher-chaperona CsuA/BABCDE, regulados por um sistema de dois componentes (BfmS/BfmR) são altamente conservados em isolados formadores de biofilme e essenciais para a adesão a superfícies abióticas.¹⁵³ Além disso, identificamos o gene *bap*, que codifica a proteína associada ao biofilme (Bap) necessária para a adesão às células brônquicas, integridade estrutural e formação de canais de água dentro do biofilme.¹⁵⁴ O gene *ompA*, que codifica uma porina essencial para a adesão em células eucarióticas, também desempenha um papel parcial na resistência sérica e na formação de biofilme.¹⁵⁵ Adicionalmente, o operon *pgaABCD* codifica as enzimas responsáveis pela produção de PNAG, um componente estrutural crucial na formação de biofilme.¹⁵⁶

A análise dos genomas de três isolados ST1 revelou variações genéticas, apesar de pertencerem ao mesmo tipo cgST851. As linhagens Ab65 e Ab147 diferiram apenas por um locus, sugerindo uma íntima relação genética e origem comum. As variações em alelos específicos indicam a diversidade genética entre os isolados, o que pode ser atribuído a eventos evolutivos, como mutações pontuais ou recombinação genética ocorrendo ao longo do tempo. Isso leva à divergência de alelos em loci específicos. Essa complexidade surge devido a fatores como a variação nas diferenças alélicas durante o ciclo de vida da bactéria, a duração da infecção (o que pode impactar o número de variantes alélicas), a frequência de mutação da bactéria e até mesmo a colônia bacteriana específica selecionada a partir da placa de agar.⁸² Em estudos anteriores, os critérios de relação para bactérias clinicamente relevantes em esquemas de cgMLST variaram de 0 a 24 loci,¹⁵⁷ demonstrando que os isolados Ab65 e Ab147 são intimamente relacionados. No entanto, a similaridade entre esses isolados, conforme determinada pela técnica de PFGE, foi de 83,5%, levando ao agrupamento em diferentes clusters. Isso mostra resultados divergentes entre as técnicas epidemiológicas empregadas, destacando a importância de complementar os dados epidemiológicos para uma compreensão mais completa das relações genéticas entre as linhagens.

Nesse contexto, outra observação importante foi o agrupamento de quatro linhagens ST730 (Ab1, Ab9, Ab13, Ab60) no cluster E, enquanto outra linhagem ST730 (Ab133) não foi agrupada com esses isolados devido a uma similaridade de 89,3%. No entanto, vale ressaltar que Ab1, foi isolada em 6 de junho de 2020, enquanto Ab133 foi isolada em 29 de setembro de 2020. Durante esse intervalo de tempo, é possível que a linhagem possa ter passado por processos de microevolução, que poderiam resultar em variações no número ou tamanho dos fragmentos de restrição, refletindo-se no padrão de bandas do PFGE. A microevolução de patógenos bacterianos pode ocorrer rapidamente dentro de um único hospedeiro devido a mutações e transferência horizontal de genes. Além disso, quando um agente patogênico é transmitido de um hospedeiro para outro, pode se deparar com um ambiente diferente com pressões seletivas distintas. Isso pode levar à rápida evolução de novas características que permitem ao patógeno se adaptar ao novo hospedeiro.

Nesse estudo, a maioria dos isolados apresentou reduzida capacidade de produção de biofilme, em consonância com os achados de Petazzoni et al. (2023)⁴⁵. Entretanto, em outro estudo conduzido com isolados de *A. baumannii* de pacientes com COVID-19, foi identificada uma habilidade moderada ou forte para formação de biofilmes em 98,44% dos casos.¹⁴³ Tanto o nosso estudo quanto os estudos mencionados compartilharam o mesmo contexto, envolvendo isolados de *A. baumannii* de pacientes com COVID-19 admitidos em UTI e submetidos à ventilação mecânica. Igualmente, esses estudos exibiram notável similaridade nos padrões de PFGE, indicando a presença de alguns *clusters* predominantes, mas com isolados pertencentes ao ST2. A diferença mais significativa entre os dois estudos foi observada na taxa de mortalidade. No estudo em que a produção de biofilme foi baixa, a taxa de mortalidade foi de 43,9%.⁴⁵ Em contraste, no estudo em que a maioria dos isolados exibiu forte produção de biofilme, a taxa de mortalidade atingiu 100%.¹⁴³

Alguns estudos sugerem que a presença de genes de resistência a antibióticos pode estar relacionada a uma formação menos robusta de biofilme em bactérias.^{159,160} No entanto, existem estudos que evidenciam o contrário.^{140,161} Para uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos e seu impacto nas infecções por *A. baumannii*, são necessárias investigações adicionais. Esses estudos não apenas fornecerão conhecimento para o desenvolvimento de terapias e estratégias preventivas contra infecções relacionadas aos biofilmes de *A. baumannii* e resistência aos antibióticos, mas também ajudarão a esclarecer como os fatores de virulência desempenham um papel crucial na capacidade de resistir a condições ambientais desafiadoras e contribuem para o surgimento de infecções graves.³³

Este estudo apresenta algumas limitações importantes a serem consideradas. Inicialmente, trata-se de um estudo descritivo conduzido em uma amostra limitada de pacientes. Devido às restrições temporais associadas às análises moleculares laboriosas e extensas, não foi possível expandir o número de isolados. Essa lacuna poderia ter sido preenchida por meio de mais amostras submetidas ao sequenciamento completo do genoma. Contudo, devido à falta de recursos financeiros no momento, essa alternativa não estava disponível. Consequentemente, não foi viável obter mais amostras de pacientes hospitalizados ao longo de todo o período da

pandemia, o que pode ter ocasionado uma falta de informações sobre a clonalidade e a distribuição temporal dos isolados.

Além disso, a ausência de um grupo de controle composto por pacientes com COVID-19, mas sem infecção por *A. baumannii*, limitou a realização de análises estatísticas mais abrangentes das características clínicas e dos desfechos entre os pacientes. Isso impactou nossa capacidade de avaliar se a presença de *A. baumannii* influenciou a mortalidade dos pacientes com COVID-19.

Outro aspecto relevante a ser considerado é que muitos pacientes, além de serem diagnosticados com infecção por COVID-19 e *A. baumannii*, também apresentaram culturas positivas para outros patógenos hospitalares importantes. Esse cenário dificulta a conclusão definitiva, por exemplo, sobre se *A. baumannii* foi o principal agente causador de PAVM em culturas polimicrobianas.

Apesar das limitações, o estudo oferece uma contribuição significativa ao investigar as características fenotípicas e genotípicas dos isolados, ampliando assim a compreensão da resistência bacteriana observada. Essa análise pode orientar estratégias mais precisas de tratamento e controle, impactando diretamente a prática clínica e as políticas de saúde pública.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo oferecem uma caracterização abrangente, tanto molecular quanto fenotípica, de *A. baumannii* em pacientes com COVID-19 internados em UTIs de um hospital de referência no Estado de São Paulo. Identificamos uma ampla disseminação de *A. baumannii* carreador do gene *bla*_{OXA-23}, destacando uma alta frequência de resistência aos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. As linhagens ST1, ST15 e ST730 foram predominantes em infecções secundárias, evidenciando isolados altamente semelhantes entre pacientes internados em diferentes períodos, sugerindo práticas inadequadas de controle de infecção. A capacidade de formação de biofilme foi observada na maioria dos isolados, com determinantes genéticos associados a esse fenótipo identificados no sequenciamento do genoma. Além disso, a população estudada foi majoritariamente de alto risco, podendo estar associada à alta ocorrência de óbitos. A compreensão dos mecanismos de resistência e disseminação do *A. baumannii* neste contexto é crucial para o desenvolvimento de estratégias direcionadas, visando reduzir as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções secundárias, especialmente após o período pandêmico de COVID-19. Essa abordagem busca prevenir desafios semelhantes no futuro e promover a segurança dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022.
2. Lobo SM, Veiga PM, Mello C. Challenges of the coronavirus pandemic for Brazilian intensivists: present and future. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2021;33(3):339–40.
3. Grasselli G, Cattaneo E, Florio G. Secondary infections in critically ill patients with COVID-19. *Crit Care*. 2021;25(1).
4. Rangel K, Chagas TPG, De-Simone SG. *Acinetobacter baumannii* Infections in Times of COVID-19 Pandemic. *Pathogens*. 2021;10(8).
5. Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom*. 2019;5(10).
6. Vázquez-López R, Solano-Gálvez SG, Vignon-Whaley JJJ, Vaamonde JAA, Alonzo LAP, Reséndiz AR, et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics* 2020, Vol 9, Page 205; 9(4):205.
7. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3).
8. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. WHO. 2017.
9. Castanheira M, Mendes RE, Gales AC. Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(Supplement_2):S166–78.
10. Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, Schultz MB, Pickard DJ, Dougan G, et al. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom*. 2016 Feb 9;2(2):1–16.
11. Dirlikov E, Zhou S, Han L, Li Z, Hao L, Millman AJ, et al. Use of public data to describe COVID-19 contact tracing in Hubei Province and non-Hubei provinces in China between 20 January and 29 February 2020. *Western Pac Surveill Response J*. 2021 Jul 1;12(3):82–7.
12. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2020;395(10229):1054–62.
13. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19? *EMBO Mol Med*. 2020 Jul 7;12(7).
14. Hughes S, Troise O, Donaldson H, Mughal N, Moore LSP. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Oct;26(10):1395–9.

15. Feldman C, Anderson R. The role of co-infections and secondary infections in patients with COVID-19. *Pneumonia*. 2021 Dec;13(1).
16. Westblade LF, Simon MS, Satlin MJ. Bacterial Coinfections in Coronavirus Disease 2019. *Trends Microbiol*. 2021 Oct;29(10):930–41.
17. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1054–62.
18. Khamis F, Memish Z, Bahrani M Al, Dowaiqi S Al, Pandak N, Bolushi Z Al, et al. Prevalence and predictors of in-hospital mortality of patients hospitalized with COVID-19 infection. *J Infect Public Health*. 2021 Jun 1;14(6):759.
19. Weiner-Lastinger LM, Pattabiraman V, Konnor RY, Patel PR, Wong E, Xu SY, et al. The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022 Jan 1;43(1):12–25.
20. Baccolini V, Migliara G, Isonne C, Dorelli B, Barone LC, Giannini D, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on healthcare-associated infections in intensive care unit patients: a retrospective cohort study. 2020.
21. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19? *EMBO Mol Med*. 2020 Jul 7;12(7):e12560.
22. Porto APM, Borges IC, Buss L, Machado A, Bassetti BR, Cocentino B, et al. Healthcare-associated infections on the intensive care unit in 21 Brazilian hospitals during the early months of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: An ecological study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022 Mar 18;1–7.
23. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi HAA, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*. 2020 Oct;72(10):2097–111.
24. Falcone M, Tiseo G, Giordano C, Leonildi A, Menichini M, Vecchione A, et al. Predictors of hospital-acquired bacterial and fungal superinfections in COVID-19: a prospective observational study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;76(4):1078–84.
25. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future Sci OA*. 2019;5(6):395–2056.
26. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care*. 2006 Mar 21;10(2):R48.
27. Ibrahim S, Al-Saryi N, Israa , Al-Kadmy MS, Sarah , Aziz N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. 2021; 48:6987–98.
28. Romanin P, Palermo RL, Cavalini JF, Fávoro LDS, De Paula-Petroli SB, Fernandes EV, et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Hospital from Brazil: The Importance of Carbapenemase Encoding Genes and Epidemic Clonal Complexes in a 10-Year Study. 2019 Oct 31;25(9):1365–73.

29. Souza ES, Belei RA, Carrilho CMD de M, Matsuo T, Yamada-Ogatta SF, Andrade G, et al. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. *Texto & Contexto - Enfermagem*. 2015;24(1):220–8.
30. Karlowsky JA, Hoban DJ, Hackel MA, Lob SH, Sahm DF. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017 May 1;21(3):343–8.
31. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3).
32. Silva DM, Menezes EMN, Silva E V., Lamounier TAC. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2017 Aug 1;53(4):240–5.
33. Moubareck CA, Halat DH. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*. 2020;9(3).
34. Kolpa M, Walaszek M, Gniadek A, Wolak Z, Dobroś W. Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Jan 11;15(1).
35. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus-acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis*. 2019 Mar 15;6:S34–46.
36. Durante-mangoli E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. 2011;407–22.
37. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Mar 13;7(MAR):249706.
38. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Breakpoint Tables. 2023;13.1.
39. Gigante V, Sati H, Beyer P. Recent advances and challenges in antibacterial drug development. *ADMET DMPK*. 2022 Mar 4;10(2):147.
40. Perez S, Innes GK, Walters MS, Mehr J, Arias J, Greeley R, et al. Increase in Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection and Colonization in an Acute Care Hospital During a Surge in COVID-19 Admissions — New Jersey, February–July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020 Dec 4;69(48):1827–31.
41. Cano-Martín E, Portillo-Calderón I, Pérez-Palacios P, María Navarro-Marí J, Fernández-Sierra A, Gutiérrez-Fernández J. A Study in a Regional Hospital of a Mid-Sized Spanish City Indicates a Major Increase in Infection/Colonization by Carbapenem-Resistant Bacteria, Coinciding with the COVID-19 Pandemic. 2021;10:1127.

42. O'Toole RF. The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Dec 1;27(12):1772.
43. Musuuza JS, Watson L, Parmasad V, Putman-Buehler N, Christensen L, Safdar N. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021; 16(5).
44. da Costa RL, Lamas C da C, Simvoulidis LFN, Espanha CA, Moreira LPM, Bonancim RAB, et al. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022 Feb 2; 64.
45. Petazzoni G, Bellinzona G, Merla C, Corbella M, Monzillo V, Samuelsen Ø, et al. The COVID-19 Pandemic Sparked Off a Large-Scale Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from the Endemic Strains at an Italian Hospital. Rather PN, editor. *Microbiol Spectr*. 2023 Apr 13;11(2).
46. AliMohammadi A, Chazani-Sharahi N, Hezaveh ZA, Abbasi E, Shariati A, Ghaznavi-Rad E. The significant role of Carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* in mortality rate of patients with COVID-19. *Vacunas*. 2022 Nov;
47. Nebreda-Mayoral T, Miguel-Gómez MA, March-Rosselló GA, Puente-Fuertes L, Cantón-Benito E, Martínez-García AM, et al. Bacterial/fungal infection in hospitalized patients with COVID-19 in a tertiary hospital in the Community of Castilla y León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021;
48. Pasquini Z, Barocci I, Brescini L, Candelaresi B, Castelletti S, Iencinella V, et al. Bloodstream infections in the COVID-19 era: results from an Italian multi-centre study. *Int J Infect Dis*. 2021 Oct 1; 111:31–6.
49. Protonotariou E, Mantzana P, Meletis G, Tychala A, Kassomenaki A, Vasilaki O, et al. Microbiological characteristics of bacteremias among COVID-19 hospitalized patients in a tertiary referral hospital in Northern Greece during the second epidemic wave. *FEMS Microbes*. 2022 Jan 13; 2:21.
50. Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int J Antimicrob Agents*. 2021 Apr 1; 57(4):106324.
51. Silva ARO da, Salgado DR, Emmerick ICM, Lima E da C. Transitional impact on *Acinetobacter baumannii* MDR infections in 5 Brazilian ICUs in 2020. *Am J Infect Control*. 2022 Feb 1;50(2):239–40.
52. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Sep 1;12(9):826–36.
53. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, De Araújo MRE, Lincopan N. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the blaOXA-143 Gene in Brazilian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Mar; 55(3):1322.

54. El-Baky RMA, Farhan SM, Ibrahim RA, Mahran KM, Hetta HF. Antimicrobial resistance pattern and molecular epidemiology of ESBL and MBL producing *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in Minia, Egypt. 2020 Jan 1; 56(1):4–13.
55. Ranjbar R, Zayeri S, Afshar D, Farshad S. Detection of OXA Beta Lactamases Among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Tehran Hospitals, Iran. Open Microbiol J. 2019 Mar 27;13(1):68–72.
56. ZanDer E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of *bla*OXA-143 Variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(5):2704.
57. Lee Y, Kim YR, Kim J, Park YJ, Song W, Shin JH, et al. Increasing prevalence of *bla*OXA-23-carrying *Acinetobacter baumannii* and the emergence of *bla*OXA-182-carrying *Acinetobacter nosocomialis* in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Oct 1;77(2):160–3.
58. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. 2011 Apr 28; 6(4):407–22.
59. Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. Mol Biol Rep. 2021 Oct 1; 48(10):6987.
60. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Res. 2011 Mar; 133(3):332.
61. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. Front Microbiol. 2020 Oct 6; 11:6.
62. Verma P, Tiwari M, Tiwari V. Efflux pumps in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status and challenges in the discovery of efflux pumps inhibitors. Microb Pathog. 2021 Mar 1;152:104766.
63. Safari M, Mozaffari Nejad AS, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci. 2015 Jul 1; 22(4):424.
64. Germovsek E, Barker CI, Sharland M. What do I need to know about aminoglycoside antibiotics? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2017 Apr 1; 102(2):89–93.
65. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resistance Updates. 2010 Dec 1;13(6):151–71.
66. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Jun 1; 6(6).
67. Falagas ME, Karveli EA, Siempos II, Vardakas KZ. *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. Epidemiol Infect. 2008 Aug; 136(8):1009.

68. Doi Y, Wachino J, Ichi, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun 1; 30(2):523.
69. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 2021;10(3):1–31.
70. Gholami M, Haghshenas M, Moshiri M, Razavi S, Pournajaf A, Irajian G, et al. Frequency of 16S rRNA Methylase and Aminoglycoside-Modifying Enzyme Genes among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *JOURNAL OF PATHOLOGY Iranian Journal of Pathology*. 2017;12(4):329–38.
71. Rafei R, Osman M, Dabboussi F, Hamze M. Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*. 2019;14(12):1065–80.
72. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van Der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep; 43(9):4328.
73. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van Der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep; 43(9):4328–35.
74. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Angeles M, Luzon D, Wisplinghoff H, et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4382–90.
75. Cui F, Liu L, Miao X, Qian H, Lu S, Tian J, et al. Epidemiological and comparative genomic analyses of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* collected between 2020 and 2022 in Liaocheng City, Shandong Province, China. *J Biosaf Biosecur*. 2023 Jun 1;5(2):60–6.
76. Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. 2018 Jul ; 50(3):327–33.
77. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Aug 1;79(4):468–72.
78. Clímaco EC, Oliveira ML de, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013 Oct 1;19:127–33.
79. Thoma R, Seneghini M, Seiffert SN, Vuichard Gysin D, Scanferla G, Haller S, et al. The challenge of preventing and containing outbreaks of multidrug-resistant organisms and *Candida auris* during the coronavirus disease 2019 pandemic: report of a carbapenem-

- resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak and a systematic review of the literature. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022 Dec 1; 11(1):1–11.
80. Cherubini S, Perilli M, Segatore B, Fazii P, Parruti G, Frattari A, et al. Whole-Genome Sequencing of ST2 *A. baumannii* Causing Bloodstream Infections in COVID-19 Patients. *Antibiotics* 2022, Vol 11, Page 955. 2022 Jul 15; 11(7):955.
 81. Abdollahi A, Aliramezani A, Salehi M, Norouzi Shadehi M, Ghourchian S, Douraghi M. Co-infection of ST2IP carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with SARS-CoV-2 in the patients admitted to a Tehran tertiary referral hospital. *BMC Infect Dis*. 2021 Dec 1; 21(1).
 82. Higgins PG, Prior K, Harmsen D, Seifert H. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2017 Jun 1; 12(6).
 83. Oliveira M, Silva E, Shelenkov A, Mikhaylova Y, Petrova L, Gaidukova I, et al. Genomic Characterization of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Obtained from COVID-19 Patients in Russia. 2022.
 84. Galac MR, Snesrud E, Lebreton F, Stam J, Julius M, Ong AC, et al. A Diverse Panel of Clinical *Acinetobacter baumannii* for Research and Development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Oct 1; 64(10).
 85. Naing S, Hordijk J, Duim B, Broens EM, van der Graaf-Van Bloois L, Rossen JW, et al. Genomic Investigation of Two *Acinetobacter baumannii* Outbreaks in a Veterinary Intensive Care Unit in The Netherlands. *Pathogens*. 2022 Feb 1; 11(2).
 86. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. NOTA TÉCNICA GVIMS / GGTES / ANVISA nº 02 / 2021 - Critérios Diagnósticos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. 2021.
 87. ANVISA. Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013;80.
 88. CLSI C and LSI. M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100. Ed31. CLSI supplement M100, editor. 2021. 608–608 p.
 89. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website. 2022.
 90. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Mar 1;18(3):268–81.
 91. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Apr 1;27(4):351–3.
 92. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Mar;35(3):305.

93. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. 2012;
94. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4):1151.
95. Dallenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Mar 1; 65(3):490–5.
96. Fallah F, Shams Borhan R, Hashemi A. Brief Communication Detection of *bla*(IMP) and *bla*(VIM) metallo- β -lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Burn Trauma*. 2013; 3(2):122–4.
97. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005;43(16):3129–35.
98. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is ISABA-1 customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Feb 1; 243(2):425–9.
99. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 May 1; 258(1):72–7.
100. Corrêa LL, Montezzi LF, Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 May 1;43(5):479–81.
101. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. *PLoS One*. 2010; 5(4):10034.
102. Sambrook J, Russel. D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol.1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; 2001. 2231p p.
103. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Res*. 2018; 3.
104. Feng Y, Zou S, Chen H, Yu Y, Ruan Z. BacWGSTdb 2.0: a one-stop repository for bacterial whole-genome sequence typing and source tracking. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8; 49(D1):D644–50.
105. Wang M, Goh YX, Tai C, Wang H, Deng Z, Ou HY. VRprofile2: detection of antibiotic resistance-associated mobilome in bacterial pathogens. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jul 5; 50(W1):W768–73.
106. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Dec 1; 75(12):3491–500.

107. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021 Jan 1; 76(1):101–9.
108. Carattoli A, Hasman H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *Methods in Molecular Biology*. 2020; 2075:285–94.
109. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1; 34(Database issue):D32.
110. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D912–7.
111. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2011 Jul;15(4):305–11.
112. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*. 2007 Aug 1; 115(8):891–9.
113. Camargo CH, Yamada AY, Nagamori FO, Rodrigues De Souza A, Ribeiro Tiba-Casas M, Aparecida De Moraes França F, et al. Clonal spread of ArmA-and OXA-23-coproducing *Acinetobacter baumannii* International Clone 2 in Brazil during the first wave of the COVID-19 pandemic. *J Med Microbiol*. 2022; 71:1509.
114. Boral J, Genç Z, Pınarlık F, Ekinci G, Kuskucu MA, İrkören P, et al. The association between *Acinetobacter baumannii* infections and the COVID-19 pandemic in an intensive care unit. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022 Dec 2; 12(1):1–7.
115. Karataş M, Yaşar-Duman M, Tünger A, Çilli F, Aydemir Ş, Özenci V. Secondary bacterial infections and antimicrobial resistance in COVID-19: comparative evaluation of pre-pandemic and pandemic-era, a retrospective single center study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021 Dec 1; 20(1):51.
116. Serapide F, Quirino A, Scaglione V, Morrone HL, Longhini F, Bruni A, et al. Is the Pendulum of Antimicrobial Drug Resistance Swinging Back after COVID-19? *Microorganisms*. 2022;10(5):1–7.
117. Kinross P, Gagliotti C, Merk H, Plachouras D, Monnet DL, Högberg LD, et al. Large increase in bloodstream infections with carbapenem-resistant *Acinetobacter* species during the first 2 years of the COVID-19 pandemic, EU/EEA, 2020 and 2021. *Eurosurveillance*. 2022 Nov 17; 27(46):2200845.
118. Ripa M, Galli L, Poli A, Oltolini C, Spagnuolo V, Mastrangelo A, et al. Secondary infections in patients hospitalized with COVID-19: incidence and predictive factors. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Mar 1;27(3):451–7.

119. Marcolino MS, Ziegelmann PK, Souza-Silva MVR, Nascimento IJB, Oliveira LM, Monteiro LS, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients hospitalized with COVID-19 in Brazil: Results from the Brazilian COVID-19 registry. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021 Jun 1; 107:300.
120. Gold MS, Sehayek D, Gabrielli S, Zhang X, McCusker C, Ben-Shoshan M. COVID-19 and comorbidities: a systematic review and meta-analysis. 2020; 749–55.
121. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020 Aug 1; 81(2):266.
122. Hughes S, Troise O, Donaldson H, Mughal N, Moore LSP. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020 Oct 1;26(10):1395–9.
123. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul; 21(3):538–82.
124. Rayeesa Faheem S, Srinivas T, Sadhana Y. A Comparative Study of *Acinetobacter* Infections in COVID and Non-COVID Patients. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*. 2022 Feb 10;8(2):250.
125. Yu H, Ezpeleta-Lobato G, Han X, Carmona-Cartaya Y, Quiñones-Pérez D. Carbapenamase-Producing *Acinetobacter baumannii* in China, Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. *MEDICC Rev*. 2022 Jul 6;24(1):59–69.
126. Mazzitelli M, Gregori D, Sasset L, Trevenzoli M, Scaglione V, Menzo S Lo, et al. Cefiderocol-Based versus Colistin-Based Regimens for Severe Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections: A Propensity Score-Weighted, Retrospective Cohort Study during the First Two Years of the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms* 2023, Vol 11, Page 984. 2023 Apr 10 ; 11(4):984.
127. Wang YC, Ku WW, Yang YS, Kao CC, Kang FY, Kuo SC, et al. Is Polymicrobial Bacteremia an Independent Risk Factor for Mortality in *Acinetobacter baumannii* Bacteremia? *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol 9, Page 153. 2020 Jan 6 ; 9(1):153.
128. Ye JJ, Lin HS, Kuo AJ, Leu HS, Chiang PC, Huang CT, et al. The clinical implication and prognostic predictors of tigecycline treatment for pneumonia involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect [Internet]*. 2011 Nov; 63(5):351–61.
129. Karakostas S, Gikas A, Astrinaki E, Kritsotakis EI. Excess mortality due to pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in hospitalized patients. *J Hosp Infect [Internet]*. 2020 Nov 1; 106(3):447–53.
130. Zheng JY, Huang SS, Huang SH, Ye JJ. Colistin for pneumonia involving multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Microbiol Immunol Infect [Internet]*. 2020 Dec 1; 53(6):854–65.
131. Karakostas S, Kritsotakis EI. Systematic review and meta-analysis of the proportion and associated mortality of polymicrobial (vs monomicrobial) pulmonary and

- bloodstream infections by *Acinetobacter baumannii* complex. *Infection* [Internet]. 2021 Dec 1; 49(6):1149–61.
132. Jean SS, Chang YC, Lin WC, Lee W Sen, Hsueh PR, Hsu CW. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumonia. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol 9, Page 275. 2020 Jan 19; 9(1):275.
 133. Li G, Shen W, Gong Y, Li M, Rao X, Liu Q, et al. Essential Fitness Repertoire of *Staphylococcus aureus* during Co-infection with *Acinetobacter baumannii* In Vivo. *mSystems* [Internet]. 2022 Oct 26;7(5).
 134. Combes A, Figliolini C, Trouillet JL, Kassis N, Wolff M, Gibert C, et al. Incidence and Outcome of Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia. *Chest*. 2002 May 1;121(5):1618–23.
 135. Polly M, de Almeida BL, Lennon RP, Cortês MF, Costa SF, Guimarães T. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *Am J Infect Control*. 2022 Jan 1; 50(1):32–8.
 136. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012; 3(3):5.
 137. Islam MdM, Kim J, Kim K, Kim D, Akter S, Bang S, et al. Complete genome sequence of the multidrug-resistant clinical isolate *Acinetobacter baumannii* KBN10P05679: Insights into antimicrobial resistance genotype and potential virulence traits. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023 Mar.
 138. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2016 Apr 12;7(APR):483.
 139. Di Domenico EG, Marchesi F, Cavallo I, Toma L, Sivori F, Papa E, et al. The Impact of Bacterial Biofilms on End-Organ Disease and Mortality in Patients with Hematologic Malignancies Developing a Bloodstream Infection. *Microbiol Spectr*. 2021 Sep 3; 9(1).
 140. Roy S, Chowdhury G, Mukhopadhyay AK, Dutta S, Basu S. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Mar 24; 9.
 141. Leal NC, Campos TL, Rezende AM, Docena C, Mendes-Marques CL, de Sá Cavalcanti FL, et al. Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. *Front Microbiol*. 2020 Jun 17;11:524286.
 142. Vasconcelos ATR, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(4):382–5.
 143. Novović K, Kuzmanović Nedeljko S, Poledica M, Nikolić G, Grujić B, Jovčić B, et al. Virulence potential of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from COVID-19 patients on mechanical ventilation: The first report from Serbia. *Front Microbiol*. 2023;14(February):1–10.

144. Shelenkov A, Mikhaylova Y, Petrova L, Gaidukova I, Zamyatin M, Akimkin V. Genomic Characterization of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Obtained from COVID-19 Patients in Russia. *Antibiotics*. 2022 Mar 1; 11(3):346.
145. Ceparano M, Baccolini V, Migliara G, Isonne C, Renzi E, Tufi D, et al. *Acinetobacter baumannii* Isolates from COVID-19 Patients in a Hospital Intensive Care Unit: Molecular Typing and Risk Factors. *Microorganisms* 2022, Vol 10, Page 722. 2022 Mar 28 [cited 2022 Apr 6];10(4):722.
146. Gottesman T, Fedorowsky R, Yerushalmi R, Lellouche J, Nutman A. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 dedicated hospital. *Infection Prevention in Practice*. 2021; 3:100113.
147. Shinohara DR, Dos Santos Saalfeld SM, Martinez HV, Altafini DD, Costa BB, Fedrigo NH, et al. Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)-specific intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2021;1.
148. Adams MD, Bishop B, Wright MS. Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. *Microb Genom*. 2016 Jul 11; 2(7).
149. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Sep 1. ;65(9):1919–25.
150. Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Sep 1; 62(9).
151. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhando T, Pathania R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017 Jan 1 ;72(1):68–74.
152. Kornelsen V, Kumar A. Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Jul 1; 65(7).
153. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (N Y)*. 2003; 149(12):3473–84.
154. Colquhoun JM, Rather PN. Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 May 29;10:544784.
155. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. *Infect Immun*. 2009 Aug; 77(8):3150.
156. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol*. 2009 Oct 1; 191(19):5953–63.

157. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering R V. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr 1; 24(4):350–4.
158. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(3):150–62.
159. Folliero V, Franci G, Dell'annunziata F, Giugliano R, Foglia F, Sperlongano R, et al. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices. *Int J Microbiol.* 2021.
160. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016 Apr 12;7(APR):483.
161. Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules.* 2019; 24(10).

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice A – Características gerais dos genomas das quatro cepas representativas de *A. baumannii*.

ID do isolado	# contigs (>= 0 bp) ¹	# contigs (>= 1000 bp) ²	C. Total (>= 0 bp) ³	C. Total (>= 1000 bp) ⁴	Total contigs ⁵	C. Total (bp) ⁶	Maior contig (bp) ⁷	N50 ⁸	GC (%) ⁹	N90 ¹⁰	auN ¹¹	L50 ¹²	L90 ¹³	# N's por 100 kbp ¹⁴	C. Total (Mb) ¹⁵
Ab65	133	47	386796	384633	55	385193	353198	204180	39.05	50524	195190.	8	20	28.56	3,85193
Ab66	273	59	386457	381877	64	382266	355334	130120	39.07	39410	160412.	9	29	28.78	3,82266
Ab111	185	33	394799	391454	36	391654	708653	320575	39.07	50788	334981.	5	14	30.64	3,91654
Ab147	207	45	388249	384441	52	384923	444608	203859	39.04	50524	212143.	8	19	28.58	3,84923

Legenda: ID, identificação; C, comprimento; pb, par de base; kbp, kilobase pair - par de bases kilobases; Mb, Megabase.

¹Contigs (>= 0 bp): Número de contigs, ou seja, fragmentos ou sequências menores do genoma com comprimento maior ou igual a 0 pares de base (bp).

²Contigs (>= 1000 bp): Número de contigs com comprimento maior ou igual a 1000 bp.

³Comprimento total (>= 0 bp): Comprimento total de todas as sequências, incluindo contigs com comprimento maior ou igual a 0 bp.

⁴Comprimento total (>= 1000 bp): Comprimento total de todas as sequências, incluindo contigs com comprimento maior ou igual a 1000 bp.

⁵Total contigs: Número total de contigs, independentemente do tamanho.

⁶Comprimento total (bp): Comprimento total de todas as sequências, considerando todas as bases pares (bp).

⁷Maior contig (bp): Comprimento do maior contig, ou seja, a sequência contígua mais longa no genoma.

⁸N50: Tamanho do contig em que, se todos os contigs fossem alinhados em ordem decrescente de tamanho, a primeira metade do genoma seria representada.

⁹GC (%): Porcentagem de bases nitrogenadas no genoma que são guanina (G) ou citosina (C).

¹⁰N90: Tamanho do contig em que, se todos os contigs fossem alinhados em ordem decrescente de tamanho, os primeiros 90% do genoma seriam representados.

¹¹auN: Média de contigs (tamanho) necessários para atingir o total de 90% do genoma.

¹²L50: Número de contigs necessários para representar metade do genoma (em ordem decrescente de tamanho).

¹³L90: Número de contigs necessários para representar 90% do genoma (em ordem decrescente de tamanho).

¹⁴N's por 100 kbp: Número de bases nitrogenadas "N" presentes em cada 100.000 bases do genoma. A letra "N" representa bases não identificadas ou ambíguas.

¹⁵Comprimento total (Mb): Comprimento total do genoma em megabases (Mb), ou seja, milhões de bases pares (bp).

8.2 Apêndice B – Perfil alélico baseado no esquema de MLST Oxford/Pasteur das quatro cepas representativas de *A. baumannii*.

Isolado	ST	MLST (Oxford)								MLST (Pasteur)							
		<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>	ST	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
Ab65	1604 ou 231	10	12	4	182	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1
Ab66	236	12	17	12	-	1	29	102	39	15	6	6	8	2	3	5	4
Ab111	1604 ou 231	10	12	4	182	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1
Ab147	1604 ou 231	10	12	4	182	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1

Legenda: MLST, *Multilocus sequence typing*

8.3 Apêndice C – Presença de genes de resistência aos antibióticos nos quatro isolados representativos de *A. baumannii*.

		Genes de resistência aos antibióticos																																							
ID		blaOXA-51	blaOXA-69	blaOXA-23	blaADC-25	ADC-182	ADC-181	sul1	qacE	qacEdelta1	ant(3'')-Ia/aadA	ant(3'')-IIc	aac(3)-Ia	aac(6')-Ib-cr	cmlB1	aac(6')-Ib	aph(3')-Ia	msr(E)	mph(E)	adeA	adeB	adeC	adeR	adeS	adeF	adeG	adeH	adeL	adeI	adeJ	adeK	adeN	abeS	AbaF	AbaQ	AmvA	LpsB	gyrA/S81L	parC/S84L, V104I,		
Ab 65	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ab 66	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ab 111	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ab 147	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

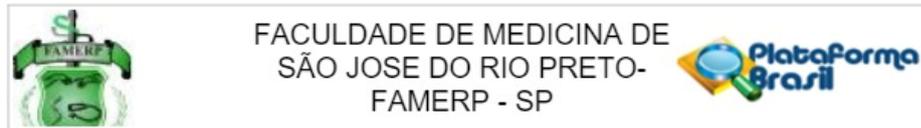
Legenda: ID, Identificação do isolado; 1, Presença do gene; 0, Ausência do gene.

8.4 Apêndice D – Presença de genes de virulência nos quatro isolados representativos de *A. baumannii*.

Isolados	Genes	Fatores de virulência	ClasseVF			
Ab147	1	ompA	Proteína de Membrana Ex.	Aderência		
Ab111	1	adeF	Bomba de efluxo/transportador AdeFGH			
Ab66	1	adeG				
Ab65	1	adeH	Proteína associada ao biofilme			
	1	bap				
	1	csuA/B	Pili Csu	Formação de Biofilme		
	1	csuA				
	1	csuB				
	1	csuC				
	1	csuD				
	1	csuE				
	1	pgaA				
	1	pgaB				
	1	pgaC				
	1	pgaD				
	1	plc	Fosfolipase C Fosfolipase D	Enzima		
	1	plcD				
	1	lpsB	LPS	Evasão Imune		
	1	lpxA				
	1	lpxB				
	1	lpxC				
	1	lpxD				
	1	lpxL				
	1	lpxM				
	1	barA				
	1	barB				
	1	basA				
	1	basB	Acinetobactin Sideróforo	Captação de Ferro		
	1	basC				
	1	basD				
	1	basF				
	1	basG				
	1	basH				
	1	basI				
	1	basJ				
	1	bauA				
	1	bauB				
	1	bauC	Heme			
	1	bauD				
	1	bauE				
	1	bauF				
	1	entE				
	1	hemO				
	1	abaI			<i>Quorum sensing</i>	Regulação
	1	abaR				
	1	bfmR			Sistema de dois componentes	
	1	bfmS				
	1	pbpG	Resistência ao Soro			

9 ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização clínica, epidemiológica e molecular das infecções secundárias em pacientes com COVID-19 admitidos em um hospital-escola de nível terciário do Estado de São Paulo

Pesquisador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47241721.0.0000.5415

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto- FAMERP - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.815.361

Apresentação do Projeto:

O estudo incluirá isolados bacterianos obtidos de pacientes diagnosticados com COVID-19 admitidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) a partir de maio de 2020, até atingir um máximo de 1000 pacientes relacionados. Os dados clínicos de cada paciente serão pesquisados no sistema eletrônico de prontuários do HB (MVPEP). Os dados incluirão idade e gênero do paciente, a data de admissão no HB, data de admissão em UTI, presença de comorbidades, material clínico coletado, data da coleta do material, identificação da espécie da(s) bactéria(s) isolada(s), resultado do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos testados, local de internação do paciente no momento da coleta da amostra clínica em questão, se apresentou quadro de pneumonia bacteriana, se necessitou de intubação orotraqueal (IOT), data da IOT, data de término da IOT, se desenvolveu quadro de sepse, se apresentou hemocultura positiva, se houve coleta de material clínico anteriormente ao da respectiva bactéria, antimicrobianos administrados ao paciente anteriormente à coleta da amostra clínica e quais foram administrados após a determinação do microorganismo em questão, data de alta de UTI, data da alta hospitalar, e desfecho.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar os isolados de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* obtidos de infecções de pacientes positivos para SARS-CoV-2 pelo teste convencional de

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 4.815.361

RT-qPCR admitidos no HB.

Objetivo Secundário:

- identificar as características clínicas e demográficas dos pacientes com COVID-19 que adquiriram infecção secundária por *A. baumannii*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* e/ou *S. aureus*;
- identificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados bacterianos;
- identificar a ocorrência de transmissão horizontal de cepas bacterianas entre os pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos para qualquer paciente, uma vez que as bactérias utilizadas neste estudo já são as mesmas isoladas dos pacientes internados a partir de exames de rotina para verificação das condições clínicas e infecciosas nos mesmos. Quanto aos manipuladores das bactérias, durante o desenvolvimento desse estudo, os riscos são mínimos uma vez que as bactérias são manipuladas em capela de biossegurança similar à utilizada no laboratório clínico do hospital onde são isoladas os respectivos microrganismos.

Benefícios:

Os resultados do estudo serão importantes para orientar a conduta dos profissionais de saúde que trabalham com pacientes infectados pelo SARSCoV-2 com relação às medidas de controle e prevenção de infecção, bem como orientar a escolha dos antimicrobianos adequados para o tratamento de infecções bacterianas secundárias nesses pacientes, resultando em melhor qualidade da assistência e maior segurança para pacientes e profissionais de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Durante a pandemia de COVID-19, têm sido observados quadros de depressão em profissionais da saúde, desencadeado pela alta demanda de trabalho, pelo isolamento social, pela diminuição nos cuidados consigo próprio, e pelo aumento da exposição a eventos emocionalmente traumáticos (KINGSTON, 2020). Isso tem favorecido a ocorrência da não aderência às medidas corretas de controle e prevenção de infecções pelos profissionais em todo o mundo (HOUGHTON et al., 2020). Assim, acreditamos encontrar grupos de isolados com alta similaridade genética entre as principais espécies bacterianas encontradas como causadoras de infecções secundárias em pacientes diagnosticados com COVID-19 admitidos no

HB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Declaração de ciência: adequado

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO CEP: 15.090-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 4.815.361

TCLE: O pesquisador requer a dispensa do TCLE sob a seguinte justificativa: Este estudo trata, exclusivamente, com amostras microbiológicas (isolados bacterianos), o que, do ponto de vista formal, não caracteriza uma pesquisa com seres humanos, conforme estabelecido pela resolução CNS nº 466/12. Ressalta-se que, apesar de as bactérias serem isoladas a partir de material humano – p.e. aspirado traqueal, sangue ou urina –, o seu crescimento e manutenção em meios de conservação e os motivos para seu isolamento acaba por descaracterizar este vínculo. Portanto, não havendo participação, de fato, de seres humanos no projeto em questão, solicito dispensa de apresentação e assinatura de TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, Resolução nº 510 de 2016 e Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1748126.pdf	25/05/2021 10:42:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_covidCEP.docx	25/05/2021 10:41:43	Mara Corrêa Lelles Nogueira	Aceito
Outros	InstrumentoColetaDados_COVID.docx	25/05/2021 10:41:19	Mara Corrêa Lelles Nogueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_COVID.PDF	25/05/2021 10:33:48	Mara Corrêa Lelles Nogueira	Aceito
Folha de Rosto	folhaRosto_COVID.PDF	25/05/2021 10:29:19	Mara Corrêa Lelles Nogueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO CEP: 15.090-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSE DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 4.815.361

SAO JOSE DO RIO PRETO, 29 de Junho de 2021

Assinado por:
BEATRIZ BARCO TAVARES JONTAZ IRIGOYEN
(Coordenador(a))

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO CEP: 15.090-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br