

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ANA CARLA THOMASSEWSKI

AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS NOSOCOMIAIS DE
Acinetobacter baumannii

PONTA GROSSA
2024

ANA CARLA THOMASSEWSKI

AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS NOSOCOMIAIS DE
Acinetobacter baumannii

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Iriane Eger

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni Da Silveira.

PONTA GROSSA
2024

T464

Thomassewski, Ana Carla

Avaliação de fatores de virulência de cepas nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* / Ana Carla Thomassewski. Ponta Grossa, 2024.

48 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Iriane Eger.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Proteases. 3. Biofilme. 4. Caseinólise. I. Eger, Iriane. II. Silveira, Rafael Bertoni da. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV.T.

CDD: 610.28

ANA CARLA THOMASSEWSKI

AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS NOSOCOMIAIS DE
Acinetobacter baumannii

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Iriane Eger

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni Da Silveira.

Aprovado em: 23 de Julho de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **IRIANE EGER**
Data: 09/10/2024 19:00:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra^a. Iriane Eger
(Orientadora – Presidente da banca)

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ RICARDO OLCHANHESKI**
Data: 09/10/2024 19:07:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski
(UNICESUMAR – Membro titular externo à UEPG)

Documento assinado digitalmente
 **MICHELE DIETRICH MOURA COSTA**
Data: 09/10/2024 20:30:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa
(UEPG – Membro titular interno)

PONTA GROSSA
2024

Aqueles que passam por nós, não se vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.

Pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse nessa etapa da minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo e amor incondicional nos momentos difíceis.

Ao meu marido Matheus, que compartilhou comigo não apenas os sorrisos, mas também as lágrimas, obrigado por celebrar cada pequena vitória e por me consolar em cada desafio.

Aos meus orientadores pela oportunidade concedida para realizar este trabalho, pela dedicação e paciência. Obrigada pelos ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

Aos meus colegas de laboratório Joyce e Rafael, por todo tempo dedicado e ajuda sempre que necessário. Agradeço pela companhia nos experimentos mais demorados.

A minha querida amiga Alana que mesmo não entendendo nada do assunto que estudei nunca deixou de estar presente. Obrigada por ser meu porto seguro a tantos anos.

As minhas grandes amigas que tive o prazer de fazer graças ao mestrado, a Carol por todas as tardes de conversa sobre a vida, a Jana por ter sido meu ombro amigo durante os surtos nas disciplinas, a Leticia por todo papo e fofocas e a Laura por nunca ter saído do meu lado nos piores momentos possíveis, não sei se estaria aqui sem vocês!

A Jana e o Bruno do laboratório de microbiologia, pelo auxílio nas atividades do laboratório, ao excelente ensinamento das técnicas, pelo amparo nos experimentos, e principalmente pela grande amizade construída ao longo desse período.

Ao professor Dr. José Rosa e ao Alisson por cederem seu tempo e conhecimento nessa reta final, para tentar fazer o gel dar certo.

À Professora Dra. Jesiane e as meninas do seu laboratório por cederem os equipamentos e por auxiliarem em diversas etapas desse processo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. Adriano Viana por ter concedido a oportunidade de realizar o estágio em docência em sua disciplina.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela estrutura e recursos financeiros e à CAPES pela concessão da bolsa.

A todas as pessoas não mencionadas aqui, mas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, oportunista e emergente como um patógeno nosocomial. Seu sucesso como agente infeccioso é atribuído a diversos fatores de virulência, destacando-se sua capacidade de formar biofilmes, liberar proteases extracelulares e desenvolver resistência a antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo investigar a secreção de proteases por diferentes cepas de *A. baumannii*, a formação de biofilme e o perfil de resistência a antibióticos, buscando entender a influência desses fatores na patogenicidade dessa bactéria. Foram analisadas vinte cepas provenientes do Hospital Universitário de Ponta Grossa, confirmadas como *A. baumannii* por meio de testes de oxidação de glicose e lactose e crescimento a 42°C. Os testes qualitativos de degradação proteolítica revelaram que, das 20 cepas analisadas, 7 (35%) apresentaram halo de degradação para ambos os meios de skim milk e ágar leite, enquanto 13 (65%) demonstraram tal característica em apenas um dos meios. Os resultados dos testes qualitativos de caseinólise em meio líquido parcialmente confirmaram esses achados, visto que apenas 20% das amostras mostraram degradação mínima da caseína. Da mesma forma, a zimografia revelou a presença de bandas de atividade enzimática em torno de 25 kDa e 10 kDa. As amostras ABHU1 e ABHU4 apresentaram atividade proteolítica em todos os testes aplicados. Além disso, demonstraram resultados satisfatórios para o teste de formação de biofilme, sendo classificadas como fortes produtores de biofilme. Todas as amostras foram resistentes aos antimicrobianos testados, com exceção à colistina. Apesar do grande número de estudo envolvendo a associação entre *A. baumannii* com os surtos hospitalares, infecções graves e resistência aos antimicrobianos, fatores que determinam a virulência e patogenicidade deste micro-organismo precisam ser estudados de modo aprofundado. Torna-se evidente que a capacidade de formação de biofilme, além de outras características desse micro-organismo, pode ser considerada como importante fator de virulência comum a um grande número de isolados *A. baumannii*. Investigações detalhadas ainda precisam ser realizadas para fornecerem novos dados sobre as proteases liberadas por diferentes cepas de *A. baumannii* e seu papel na patogênese.

Palavras chave: *Acinetobacter baumannii*; proteases; biofilme; caseinólise.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative coccobacillus, opportunistic, and emerging as a nosocomial pathogen. Its success as an infectious agent is attributed to several virulence factors, particularly its ability to form biofilms, release extracellular proteases, and develop resistance to antimicrobials. This study aimed to investigate the secretion of proteases by different strains of *A. baumannii*, biofilm formation, and antibiotic resistance profiles, seeking to understand the influence of these factors on the pathogenicity of this bacterium. Twenty strains from the University Hospital of Ponta Grossa were analyzed and confirmed as *A. baumannii* through glucose and lactose oxidation tests and growth at 42°C. Qualitative tests of proteolytic degradation revealed that, of the 20 strains analyzed, 7 (35%) showed a degradation halo for both skim milk and milk agar media, while 13 (65%) exhibited this characteristic in only one of the media. The results of the qualitative caseinolysis tests in liquid medium partially confirmed these findings, as only 20% of the samples showed minimal casein degradation. Similarly, zymography revealed the presence of enzymatic activity bands around 25 kDa and 10 kDa. The samples ABHU1 and ABHU4 showed proteolytic activity in all applied tests. Furthermore, they demonstrated satisfactory results for the biofilm formation test, being classified as strong biofilm producers. All samples were resistant to the tested antimicrobials, except for colistin. Despite the large number of studies involving the association between *A. baumannii* with hospital outbreaks, severe infections, and antimicrobial resistance, factors that determine the virulence and pathogenicity of this microorganism need to be studied in depth. It becomes evident that the ability to form biofilms, in addition to other characteristics of this microorganism, can be considered an important virulence factor common to a large number of *A. baumannii* isolates. Detailed investigations still need to be conducted to provide new data on the proteases released by different strains of *A. baumannii* and their role in pathogenesis.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; proteases; biofilm; caseinolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Colônias de <i>A. baumannii</i> em ágar MacConkey.....	15
Figura 2 –	Características Morfológicas da Colônia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	31
Figura 3 –	Coloração de Gram de uma cultura de <i>Acinetobacter baumannii</i>	31
Figura 4 –	Teste bioquímico de degradação de glicose realizado em uma das amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i>	32
Figura 5 –	Resultados da triagem da produção ou secreção de proteases....	33
Figura 6 –	Resultados da caseinólise em meio líquido. Após análise de variância (ANOVA).....	34
Figura 7 –	Zimograma revelando a atividade enzimática em caseína.....	35
Figura 8 –	Classificação das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> segundo a sua capacidade de formar biofilme	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Principais proteases bacterianas e suas funções.....	25
Quadro 2 –	Classificação dos Microrganismos Formadores de Biofilme com Base na Densidade Óptica (DO).....	30
Quadro 3 -	Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAP - Proteínas associadas a biofilme
BSA- Albumina sérica bovina
EPS -Matriz Polissacarídica Extracelular
ICS - Infecções da corrente sanguínea
IRAS- Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
LPS - Lipopolissacarídeos
OF - Oxidação-fermentação
OMPa - Proteína A da membrana externa
OMS- Organização Mundial de Saúde
OMVs - Outer Membrane Vesicles
PAV - Pneumonia associada à ventilação mecânica
PBPs - Proteínas ligadoras de penicilina
PBS- Solução salina tamponada com fosfato
SDS - Dodecil sulfato de sódio
UTI – Unidades de terapia intensiva
VRE-*Vancomycin-Resistant Enterococci*
ZUR - Proteína reguladora de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	15
3.1.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16
3.1.2	Importância Clínica	17
3.1.3	Fatores De Virulência e Patogenicidade	18
3.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	20
3.3	PROTEASES	23
3.3.1	Proteases Bacterianas	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	AMOSTRAS	27
4.2	MANUTENÇÃO DAS CEPAS	27
4.3	TRIAGEM PARA A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	28
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR CASEINOLISE ...	28
4.5	ZIMOGRÁFIA DE PROTEASES	29
4.6	FORMAÇÃO DE BIOFILME	30
4.7	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
4.8	ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	31
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
5.2	TRIAGEM DOS ISOLADOS PARA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	34
5.3	CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR CASEINÓLISE EM MEIO LÍQUIDO	34
5.4	ZIMOGRÁFIA DE PROTEASES	34
5.5	FORMAÇÃO DE BIOFILME	35
5.6	SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	36
6	DISCUSSÕES	38
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista associado a uma ampla variedade de infecções, como pneumonias, bacteremias, infecções do trato urinário e meningites, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Este microrganismo representa um sério problema de saúde pública devido à sua notável capacidade de sobrevivência prolongada em diferentes ambientes, à sua capacidade de adquirir múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana e à rápida disseminação nos ambientes hospitalares (Lee *et al.*, 2017).

É um patógeno que possui diversos fatores de virulência, os quais desempenham um papel fundamental na colonização e na patogênese das infecções. Entre esses fatores, destacam-se a capacidade de formar biofilmes, permitindo ao microrganismo sobreviver por longos períodos em superfícies secas, a habilidade de adquirir nutrientes essenciais como ferro em ambientes com baixa disponibilidade, a produção e liberação de enzimas lipolíticas, e a presença abundante de proteínas de membrana externa (Leitão, 2020; Peleg *et al.*, 2008).

A formação de biofilme está associada à virulência de *Acinetobacter baumannii*, facilitando a colonização da mucosa do hospedeiro e o crescimento bacteriano em superfícies abióticas, contribuindo, assim, para infecções associadas a dispositivos médicos e para a sobrevivência ambiental (Lucidi, 2023).

A produção de enzimas extracelulares com atividades lipolítica e proteolítica é de grande importância na patogênese, pois executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas, como em processos de catabolismo de proteínas, a coagulação sanguínea, crescimento e migração celulares, formação de tecidos, morfogênese durante o desenvolvimento, inflamações e crescimento de tumores, ativação de zimogênios, liberação de hormônios, e também o transporte de proteínas através das membranas. Sua importância no metabolismo essencial e na regulação fisiológica explicam a sua ocorrência em todos os organismos vivos (Queiroz, *et al.*, 2020).

De modo geral, proteases intracelulares iniciam um papel crítico na regulação do metabolismo, enquanto que proteases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes

proteínas em pequenas moléculas para subsequente absorção celular (Pollaro *et al.*, 2012). As proteases desempenham um papel importante na virulência e patogênese de *A. baumannii*, pois são fundamentais para a capacidade de degradar proteínas hospedeiras, permitindo a colonização e a disseminação eficiente dessa bactéria no hospedeiro (Jariyarattanarach,2022).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os fatores de virulência em cepas nosocomiais de *A. baumannii* isoladas do laboratório do Hospital Universitário de Ponta Grossa, através de sua atividade proteolítica e formação de biofilme além do perfil de resistência das cepas a antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar cepas nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* para produção e liberação de fatores de virulência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triar as cepas com atividade proteolítica;
- Analisar o perfil de secreção de proteases;
- Verificar a produção de biofilme pelas cepas;
- Avaliar a suscetibilidade das cepas a diferentes antimicrobianos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Acinetobacter*

De acordo com a taxonomia atual, o gênero *Acinetobacter* possui mais de 50 espécies descritas, caracterizadas como cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores, pertencentes à família Moraxellaceae (LPSN, 2020). A maioria das espécies cresce bem em ágar MacConkey, produzindo uma coloração rosa, devido à oxidação fraca da lactose (Peleg *et al.*, 2008).

Figura 1: Colônias de *A. baumannii* em ágar MacConkey.



Fonte: os autores (2023)

As bactérias deste gênero, na fase de crescimento exponencial, apresentam forma de bacilos, muitas vezes em pares ou em cadeias de comprimento variável. Já na fase estacionária aparecem como cocobacilos. (Chagas, 2015).

As provas presuntivas para a identificação das espécies do gênero *Acinetobacter* incluem a ausência de citocromo-oxidase, motilidade negativa e resistência à penicilina. *A. baumannii* é sacarolítica e utiliza os carboidratos de forma oxidativa no meio oxidação-fermentação (OF) (Melo, 2014).

Amplamente distribuídas na natureza, as bactérias do gênero *Acinetobacter* são facilmente recuperadas de superfícies úmidas e secas; podendo ser encontradas no solo, no esgoto, na água, em frutas, vegetais e nas membranas mucosas de humanos (Howard *et al.*, 2012).

Ao longo dos últimos 30 anos, a história taxonômica deste gênero foi amplamente modificada. O primeiro microrganismo foi descrito em 1908 como

Diplococcus mucosus, depois em 1911, denominado por Beijerinck, como *Micrococcus calcoaceticus*, e mais tarde, em 1954, de acordo com suas características fenotípicas, foi denominado por *Acinetobacter* (Peleg *et al.*, 2008). A espécie *Acinetobacter baumannii* foi registrada apenas em 1986 por Bouvet e Grimont (Alves, 2020).

Embora a maioria das espécies de *Acinetobacter* seja considerada não patogênica, é crucial destacar que algumas delas são capazes de causar graves infecções para os seres humanos (Touchon *et al.*, 2014). As espécies clinicamente mais relevantes do gênero *Acinetobacter* pertencem ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* (Acb). Este complexo consiste em cinco espécies patogênicas: *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijkshoorniae*, *Acinetobacter calcoaceticus* (espécie não patogênica) e *Acinetobacter baumannii* (Lucidi, 2023).

A. baumannii é a espécie mais bem caracterizada e de maior importância clínica e sua inclusão no complexo Acb se dá pela incapacidade de distinção fenotípica dela com os microrganismos do mesmo gênero (Aida, 2019).

3.1.1 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii é encontrada quase exclusivamente em ambiente hospitalar, principalmente UTIs. Pode também ser observada na medicina veterinária com infecções e colonizações de animais gravemente doentes em clínicas e UTIs veterinárias. Há relatos de *Acinetobacter baumannii* sendo ocasionalmente isolado em animais, como porcos, e em reservatórios naturais, incluindo vegetais e plantas agrícolas. É necessário investigar se esses isolados incomuns resultam de contaminação por ambientes hospitalares ou se refletem a presença de um reservatório natural dessa espécie (Antunes *et al.*, 2014).

É classificada pela Sociedade Mundial da Saúde como um dos seis microrganismos multirresistentes mais relevantes encontrados em unidades de saúde (OMS, 2017). Apresentam um metabolismo altamente versátil, sobrevivendo em ambientes com condições físicas adversas, como variações de pH, temperatura. Esses fatores favorecem a transmissão e dispersão do organismo, principalmente em ambiente hospitalar (Tiwari *et al.*, 2015).

3.1.2 Importância Clínica

A. baumannii é uma bactéria potencialmente oportunista, que representa 2 a 10% de todas as infecções hospitalares de bactérias Gram-negativas ao redor do mundo (Kröger, 2016). O gênero faz parte da microbiota normal da pele, frequentemente encontrado em zonas úmidas (virilha, axilas, espaços interdigitais) e no trato gastrointestinal (boca, garganta, reto) (Chagas, 2015).

Infecções hospitalares ou nosocomiais são comuns ao redor do mundo. Nos últimos anos, foi possível notar que os hospitais e instituições de cuidado de saúde são, cada vez mais, epicentros de patógenos multirresistentes (Cunha, 2021). A OMS (Organização Mundial da Saúde) define uma infecção nosocomial como uma contaminação adquirida dentro da unidade de saúde, ou seja, quando o paciente chega a esse local por um motivo diferente a uma infecção bacteriana (OMS, 2022).

A. baumannii pertence ao grupo de bactérias prevalentes em hospitais e resistentes a antimicrobianos, denominado de patógenos ESKAPE, que incluem as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. As infecções causadas por este grupo de microrganismos resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade, altos custos de saúde, de diagnóstico e de tratamento difíceis (Denissen *et al.*, 2022).

A. baumannii se destaca como um dos principais patógenos responsáveis por Infecções Relacionadas a Saúde (IRAS) e surtos hospitalares, particularmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs), geralmente acometendo pacientes hospitalizados submetidos a procedimentos invasivos ou imunossuprimidos (Da Cunha, 2019). Normalmente, os casos de infecções estão associados à comorbidades, como alcoolismo, tabagismo, diabetes e doença pulmonar obstrutiva crônica (Falagas *et al.*, 2008).

Em seres humanos esse microrganismo pode causar meningite, septicemia, endocardite, abscessos e infecções do trato urinário e infecções secundárias de feridas causadas por traumas ou cirurgias (Lihua *et al.* 2016).

A manifestação clínica mais comum das infecções é a pneumonia. O fator predisponente mais importante é a capacidade de aderência desta bactéria às células do epitélio respiratório, associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em UTIs, agravando a resposta clínica e aumentando o tempo de internação destes pacientes (Barbosa, *et al.*, 2023).

O impacto clínico nas IRAS causadas por *A. baumannii* foi rapidamente percebido, pois houve um aumento significativo no tempo de hospitalização destes pacientes e no uso extensivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro, pois o maior problema de fato em relação à essas cepas é a capacidade de adquirir mecanismos de resistência a diversos agentes antimicrobianos, tendo como consequência a fácil disseminação entre os pacientes e a persistência no ambiente hospitalar, com difícil erradicação (Howard *et al.*, 2012).

3.1.3 Fatores De Virulência e Patogenicidade

A capacidade das bactérias patogênicas de causar doenças nos hospedeiros é essencialmente determinada pela presença e atividade de múltiplos fatores de virulência. Esses fatores podem operar de maneira independente ou em sinergia durante diferentes estágios da infecção e podem ser classificados em diversos grupos de acordo com suas funções específicas (Faváro, 2024). Frequentemente, os fatores de virulência estão envolvidos em interações diretas com os tecidos do hospedeiro ou em mecanismos que mascaram a célula bacteriana das defesas imunológicas do hospedeiro (Wu *et al.*, 2008).

Os fatores de virulência microbianos abrangem uma ampla gama de biomoléculas secretadas como toxinas, enzimas e polissacarídeos, bem como de estruturas da superfície celular como cápsulas, lipopolissacarídeos, glicolipoproteínas (Leitão *et al.*, 2020). Além disso, alguns produtos microbianos secretados têm a capacidade de entrar na célula hospedeira e manipular seu maquinário, contribuindo para o sucesso da infecção (Leitão *et al.*, 2020).

Com presença de uma matriz extracelular, os biofilmes são organizações multicelulares bacterianas capazes de aderir a qualquer superfície, fornecem um mecanismo para as células sobreviverem ao estresse ambiental, por meio de resistência física (Ching *et al.*, 2019). É provável que os biofilmes tenham um importante papel nas interações patógeno-hospedeiro e a formação desse fator de virulência contribui para infecções associadas a dispositivos médicos, pois essas comunidades de biofilme formam-se na maioria de superfícies abióticas, incluindo tubos endotraqueais, peças de policarbonato e aço inoxidável (Garcia-Quintanilha, 2013).

Este mecanismo está diretamente relacionado a presença de polissacarídeos capsulares que envolvem toda a célula e também fornecem defesa ao ambiente externo (Giannouli *et al.*, 2013). Esses polissacarídeos são compostos por unidades repetidas de carboidratos, que funcionam como uma rede de glicano, que protegem a célula contra as reações do sistema imunológico, como a fagocitose e de alguns antimicrobianos (Clemmer *et al.*, 2011).

Além da defesa proporcionada pelos polissacarídeos capsulares, outro mecanismo crucial para a sobrevivência do patógeno envolve fatores internos, como a liberação de fosfolipases. Essas enzimas hidrolíticas desempenham um papel essencial na lipólise de fosfolipídeos das membranas celulares, contribuindo para a desestabilização das membranas das células hospedeiras e, conseqüentemente, resultando em efeitos citotóxicos (Lee *et al.*, 2017). Dentre elas, destacam-se a fosfolipase D, que auxilia na persistência do patógeno no soro humano, e a fosfolipase C, que é especialmente tóxica para as células epiteliais (Waack, 2013).

Ao lado da liberação de fosfolipases, outro fator intrínseco de virulência que merece destaque é a ação das enzimas proteolítica que possuem funções chave como clivar componentes imunológicos do hospedeiro e danificar os tecidos, facilitando a invasão do patógeno na célula hospedeira (Marquart *et al.*, 2021). Uma das proteases já descritas na literatura é a Lon protease, que pertencente a uma família de enzimas dependentes de ATP, responsáveis pela degradação de proteínas (Ching *et al.*, 2019).

Além disso, para sustentar a infecção e multiplicação nos tecidos e fluidos corporais do hospedeiro, o patógeno também depende de fatores como a obtenção de ferro a qual é crucial para sua patogênese, por ser um micronutriente essencial para as bactérias infectarem e se multiplicarem nos tecidos e fluidos corporais do hospedeiro (Shapiro, 2012). Embora os hospedeiros eucarióticos tentem limitar a disponibilidade de ferro por meio da imunidade nutricional, *A. baumannii* demonstrou uma aptidão biológica notável ao desenvolver estratégias para recuperar esses escassos nutrientes in vivo. Entre os mecanismos mais eficazes para a obtenção de ferro está a liberação de moléculas quelantes conhecidas como sideróforos. As acinetobactinas, por exemplo, representam um tipo altamente conservado de sideróforo, com uma afinidade particular pelo ferro sob as condições ácidas frequentemente encontradas durante infecções agudas (Gaddy *et al.*, 2012; Shapiro *et al.*, 2012).

Assim como o ferro, outro metal essencial que é controlado pelos hospedeiros eucarióticos é o zinco, um cofator estrutural vital para muitas enzimas. Para competir por esse recurso escasso, *A. baumannii* conta com um sistema de alta afinidade denominado ZnuABC para a aquisição de zinco. Este sistema é ativado especialmente sob condições de depleção de zinco, garantindo que a bactéria possa superar as defesas nutricionais do hospedeiro e sustentar sua sobrevivência e virulência (Moore et al., 2014).

A capacidade adaptativa das bactérias patogênicas, evidenciada por seus fatores de virulência, não apenas facilita a infecção, mas também desempenha um papel crucial na resistência a tratamentos antimicrobianos.

3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são agentes químicos que inibem o crescimento bacteriano. Os mecanismos de ação destes medicamentos incluem o rompimento da membrana celular, a inibição das vias metabólicas das bactérias, a inibição da síntese proteica e de ácidos nucleicos (Sanseverino et al., 2018). Estes medicamentos são divididos em dois grandes grupos: os beta-lactâmicos e os não beta-lactâmicos (Andrade et al., 2017).

Os beta-lactâmicos são os fármacos que possuem em sua estrutura um anel beta-lactâmico. Essa classe é dividida em outras subclasses: as penicilinas; as cefalosporinas, clavulanatos, os monobactâmicos e os cabapenêmicos (Andrade et al., 2017). As demais classes de antibióticos pertencem ao grupo dos não beta-lactâmicos e possuem diferentes mecanismos de ação. Fazem parte desse grupo os aminoglicosídeos, as quinolonas, as tetraciclina, os lipopeptídeos, os glicopeptídeos (Andrade et al., 2017).

Há uma ampla gama de mecanismos de resistência que capacitam as bactérias a evitarem os efeitos dos antimicrobianos. Essa seleção pode se manifestar tanto durante o tratamento com o agente farmacológico quanto posteriormente, uma vez que resíduos medicamentosos podem persistir no meio ambiente por períodos prolongados após o término do tratamento (Cunha, 2019).

Estes mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ou adaptativos. A resistência intrínseca vem das características da própria espécie ou da família bacteriana, sendo uma consequência dos processos evolutivos e adaptativos que já

ocorram entre as espécies. Por exemplo, todas as bactérias Gram-negativas são resistentes a vancomicina devido ao seu elevado peso molecular (Barrocas, 2016). Já os mecanismos adaptativos capacitam o patógeno a produzir enzimas de inativação do antibiótico, induzir o efluxo do fármaco do interior da célula do hospedeiro, modificar o sítio ativo onde o medicamento se liga e ou gerar uma via metabólica alternativa que evita a ação do fármaco (Cunha, 2019).

Os isolados de *A. baumannii* são classificados como multi-droga-resistentes (MDR), extensivamente-droga-resistentes (XDR) e pan-droga-resistentes (PDR), de acordo com a sua resistência a uma ou mais classes de antibióticos. Assim, cepas resistentes a três ou quatro classes de drogas são classificadas como MDR; aquelas resistentes a cinco ou seis classes de antimicrobianos são denominadas XDR; e cepas resistentes às sete classes de antibióticos testados são consideradas PDR, apresentando o tipo mais absoluto de resistência, pois não há antimicrobianos com atividade contra essas cepas (Magiorakos *et al.*, 2013).

De acordo com Kyriakidis *et al.* (2021), os mecanismos de resistência encontrados nos microrganismos podem ser classificados em três grupos: I) redução da permeabilidade da membrana ou aumento do efluxo do antibiótico, impedindo o acesso ao alvo; II) proteção ou camuflagem do alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-traducional; III) inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação.

Diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos foram descritos para o gênero *Acinetobacter*, em particular os mecanismos enzimáticos, tais como a produção de oxacilinases e β -lactamases que possuem atividade contra os antibióticos carbapenêmicos (Livermore, 2007).

As β -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas. Os genes que codificam a produção destas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (Oliveira, 2024). Diversas destas enzimas já foram descritas em *Acinetobacter*, porém as classes B e D apresentam maior frequência e atividade hidrolítica sobre os carbapenêmicos, sendo denominadas também como carbapenemases (Faria *et al.*, 2022).

Dentre os mecanismos não-enzimáticos relatados, os mais observados são as bombas de efluxo, que contribuem para uma diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula, alterações no sítio de ligação do antibiótico

proporcionando a perda de sua atividade, e alteração na expressão dos canais de porina dificultando a penetração e ação dos antibióticos (Melo, 2014). Diversos tipos de bombas de efluxo foram identificadas em inúmeras espécies bacterianas. Em *A. baumannii* foi caracterizada a bomba de efluxo AdeABC, responsável por resistência a aminoglicosídeos, cefotaxima, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetopim e fluoroquinolonas (Cunha, 2019).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema crescente, com *A. baumannii* exemplificando a capacidade de resistência multifacetada. Mecanismos que desempenham papéis críticos na proteção desse patógeno contra os tratamentos disponíveis, destacando a complexidade dos desafios no controle de infecções nosocomiais.

3.3 PROTEASES

Os fatores de virulência de *Acinetobacter baumannii* frequentemente incluem a produção de proteases, que ocorrem naturalmente em todos os organismos e correspondem a 1-5% de seus conteúdos celulares. São encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos (Zimmer *et al.*, 2009). As proteases, também conhecidas como peptidases, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas dentro de polipeptídeos e proteínas. Por muito tempo uma única função era atribuída às proteases, a de renovar ou digerir proteínas para servir de fonte de alimento. Atualmente, fica claro que a hidrólise de uma ligação peptídica pode ter uma ampla gama de efeitos biológicos muito específicos (Barrett *et al.*, 2004). As enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, entre outros. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de muitos microrganismos patogênicos (Muri *et al.*, 2002).

Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as peptidases pertencem à classe 3 e subclasse 3.4, que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases. As exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (Rao *et al.*, 1998).

A descoberta de novas proteases provenientes de diversas fontes tem impactado o sistema de classificação dessas enzimas nos últimos anos. Os cientistas têm tentado classificar as proteases com base em sua origem (animal, vegetal ou microbiana), ação catalítica (endopeptidases ou exopeptidases), pH (ácido, neutro ou alcalino), peso molecular (baixo, médio ou alto), carga (positiva ou negativa), especificidade de substrato (queratinase, elastase, colagenase) e natureza do sítio ativo (serina, metalo, aspártica). O banco de dados MEROPS classifica as proteases em nove famílias: glutâmica, asparagina, aspártica, mista, serina, treonina e tipo desconhecido, com base em uma classificação hierárquica e estrutural. No entanto, nenhum destes sistemas é capaz de classificar completamente as proteases, refletindo a complexidade e diversidade destas enzimas (Matkawala *et al.*, 2021).

3.3.1 Proteases Bacterianas

As proteases desempenham importantes papéis nos mecanismos de virulência ao longo de todo o ciclo infeccioso do patógeno. As proteases secretadas facilitam a penetração e a disseminação eficiente do microrganismo, pela participação e degradação das barreiras físicas do hospedeiro. Além disso, as enzimas proteolíticas permitem a colonização, combatendo os mecanismos de defesa. Diversas proteases desempenham papéis reguladores que permitem resposta adequada do patógeno às mudanças do ambiente e para desencadear a infecção no momento mais apropriado para a bactéria (Gur *et al.*, 2011).

Foram evidenciados papéis ainda mais sutis para as proteases bacterianas na interação entre o hospedeiro e os microrganismos invasores, incluindo a interrupção das vias de ativação em cascata, a desorganização da rede de citocinas, a excisão de receptores de superfície celular e a inativação de inibidores de proteases do hospedeiro (Barra, 2021). Existem muitas proteases bacterianas importantes, cada uma desempenhando papéis específicos na fisiologia e na patogênese bacteriana (quadro 1).

Quadro 1: Principais proteases bacterianas e suas funções.

Lon	A protease Lon é uma protease citoplasmática ATP-dependente que desempenha um papel fundamental na degradação de proteínas mal dobradas e na regulação da expressão gênica em várias bactérias.
Clp	As proteases do complexo Clp são ATP-dependentes, envolvidas na degradação de proteínas mal dobradas, além de desempenharem papéis regulatórios em resposta ao estresse celular e ambiental.
HtrA	A protease HtrA, também conhecida como DegP, é uma serina protease também dependente de ATP que degrada proteínas danificadas pelo estresse térmico e na manutenção da integridade da membrana celular.
FtsH	É uma protease transmembranar tipo AAA+ que degrada proteínas associadas à membrana celular, bem como na regulação da divisão celular e homeostase proteica.
Tsp protease	A protease tripartida é uma serina protease serina dependente de ATP envolvida na degradação de proteínas mal dobradas e na resposta ao estresse celular.
Metaloproteínases	Essas proteases dependem de íons metálicos para sua atividade catalítica e degradam proteínas da matriz extracelular, e tem papeis cruciais na patogenicidade de várias bactérias.

Fonte: Supuran (2001), Maeda (1996), Hanza,(2017).

Existe dezenas de proteases bacterianas bem conhecidas que interagem com seus hospedeiros durante uma infecção patogênica. Como por exemplo, a toxina do antraz de *Bacillus anthracis*, composta por três tipos proteicos diferentes dos quais

uma metaloprotease é um fator letal, capaz de clivar e inativar especificamente a MAP quinase (MacGregor, 2007).

Em *A. baumannii*, diversas proteases foram identificadas e estudadas. Por exemplo, as metaloproteinases, como a ZmpA, cuja função tem sido implicada na degradação de proteínas do hospedeiro, facilitando a invasão e a sobrevivência bacteriana. Além disso, as serino proteases, como a OmpA, têm sido associadas à virulência e à resistência a antibióticos em *A. baumannii* (Marr *et al.*, 2007). A família de proteases Lon são enzimas intracelulares ATP-dependentes, evolutivamente conservadas, responsáveis pela degradação direcionada de proteínas mal dobradas e de certas proteínas reguladoras (Marr *et al.*, 2007).

As proteases desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de virulência de *Acinetobacter baumannii*, facilitando a invasão e a persistência do patógeno no hospedeiro. Essas enzimas contribuem para a superação das defesas imunológicas e estão associadas à resistência aos tratamentos antimicrobianos. Adicionalmente, *A. baumannii* é conhecido por formar biofilmes, que aumentam sua capacidade de persistir em ambientes clínicos. Compreender como as proteases e a formação de biofilmes influenciam a patogenicidade de *A. baumannii* é essencial para aprofundar o conhecimento sobre infecções nosocomiais resistentes e os desafios associados a elas, evidenciando a importância de estudos contínuos sobre fatores de virulência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

No período entre maio de 2022 e dezembro de 2023 foram recebidas vinte cepas bacterianas, provenientes do laboratório do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HU/UEPG), cultivadas em placas de ágar bacteriológico, já devidamente identificadas como *A. baumannii* por meio do sistema automatizado Vitek®. Cada cepa foi nomeada como ABHUX, com uma numeração conforme a ordem de recebimento. Nenhuma das amostras continha informação sobre o(a) paciente.

Dentre todas as cepas recebidas, 75% (n=15) eram provenientes de escarro de pacientes entubados, 5% (n=1) de urina, 10% (n=2) da ponta do cateter e os 10% restantes (n=2) foram provenientes de outros lugares (não informado no recebimento).

4.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (3% de ágar + 1,3% de caldo nutriente – Merck, Chicago, EUA) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 24 horas de cultivo, as cepas foram preservadas a temperatura ambiente em um tubo inclinado contendo ágar nutriente. Além disso, as cepas foram criopreservadas em meio glicerol (glicerol 50% + 1,3% de caldo nutriente - Merck, Chicago, EUA) em freezer a -10°C .

Para confirmar as características fenotípicas das cepas de *A. baumannii* foram realizados os testes: morfotintorial pelo método de Gram; bioquímico de oxidação-fermentação (OF) (Renylab, Barbacena, BR) da glicose, da glicose anaeróbio e da lactose e biológico do crescimento em caldo nutriente 1,3% (Merck, Chicago, EUA) a 44°C por 24 horas (Peleg *et al.* 2008).

4.3 TRIAGEM DAS CEPAS PARA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para a determinação da atividade proteolítica das cepas utilizou-se o teste de formação de halo em placas de Ágar leite (Molico Desnatado 2% + Ágar 3% - Sigma) e Ágar Skim Milk (Molico Desnatado 2,8% + Ágar 1,5% - Merck, Chicago, EUA + Glicose 0,1% - BioRad, Rio de Janeiro, BR + Triptona 0,5% - Merck, Chicago, EUA +

Extrato de levedura 0,25% - BioRad, Rio de Janeiro, BR). As bactérias foram inoculadas com agulha nas placas e incubadas a 30°C durante 24h, a leitura foi realizada qualitativamente pela observação formação dos halos ao redor da colônia.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR CASEINÓLISE

Após o resultado positivo na triagem, uma colônia de cada amostra foi transferida para um erlenmeyer contendo 20 mL de caldo nutriente 0,5% (Merck,Chicago,EUA) e mantido por 24 horas, em estufa a 37°C. Após o crescimento, os meios foram centrifugados por 15 minutos, a 4.730 x g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. Como controle negativo foi utilizado o caldo nutriente 0,5% (Merck,Chicago,EUA) sem nenhum inóculo e como controle positivo foi utilizado a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Para o experimento da degradação da caseína (caseinólise) 800 µL do sobrenadante de cada uma das cepas e dos controles – em triplicatas - foram incubados com 200 µL de uma solução mãe de caseína 50% (Caseína 0,5% (BioRad, Rio de Janeiro, BR) + PBS 5% (Merck,Chicago,EUA)) em banho maria a 37°C por 24 horas. Como controle da reação utilizou-se tripsina de pâncreas de suíno (BioRad, Rio de Janeiro, BR) a 1 mg/µL diluída em PBS.

A caseinólise foi avaliada através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976- BioRad, Rio de Janeiro, BR). Foi adicionado 1mL da solução de Bradford diluído 1/5 com 25 µL da solução da caseinólise. Após 10 minutos, a leitura foi realizada por espectrofotometria a 595 nm.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR ZIMOGRRAFIA

Todas as cepas foram cultivadas em meio nutriente 0,5% (Merck, Chicago, EUA) a 37 °C, sob agitação até atingirem a $DO_{630nm} = 0,8$. Os sobrenadantes, após centrifugados (por 15 minutos, a 4.730 xg, a 4°C), foram submetidos ao teste de Bradford (1976) para quantificação de proteínas totais. Para a formação da curva padrão, foram utilizadas amostras de BSA em concentrações crescentes conhecidas variando de 0,1 mg/mL até 1 mg/mL. Utilizou-se uma placa de 96 poços, onde 20 µL de cada amostra foi adicionado em cada poço em triplicata. Após isso, foi adicionado 200 µL do reagente de Bradford. A leitura da absorbância foi realizada por um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

Os dados de absorbância obtidos foram transferidos para o software Excel 2019, onde foi gerado a curva padrão e a equação da reta através dos dados obtidos pela absorbância das amostras de BSA. Utilizando a equação da reta gerada, foi calculada a estimativa da concentração de proteínas totais por μL das amostras.

Em seguida, 1,5 μg de proteínas totais de cada uma das amostras foram homogeneizadas com 5 μL de tampão Laemmli (BioRad, São Paulo, BR) não reduzido e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, contendo 5% de gelatina. A corrida eletroforética foi realizada a 4°C. Inicialmente a corrida foi realizada a 100 V por aproximadamente 15 minutos até as amostras chegarem ao gel de corrida. Depois disso, a tensão foi aumentada para 120 V para a realização da corrida por aproximadamente 2h e 30 min.

Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes (30 minutos) em 2% de Triton X-100 sob agitação e, em seguida foram imersos em tampão de ativação de enzimas (CaCl_2 2M; Tris-HCl 1M) durante 16h a 37°C. Os géis foram então corados com Comassie Blue até que as bandas de degradação de gelatina pudessem ser detectadas. Os géis foram escaneados para registro da atividade das proteases.

4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para a avaliação da formação de biofilme *in vitro* foi utilizada a estratégia metodológica descrito por Stepanovic *et al.* (2004), com modificações. Para este teste foram utilizadas placas estéreis de 96 poços. Como controle negativo, na primeira linha da placa, foi adicionado apenas 200 μL do meio de cultura Luria Bertani (LB) 5% (Kasvi, Pinhais, BR). Como controle positivo foi utilizado a bacterina Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Para todos os outros poços foi realizada uma suspensão bacteriana, utilizando a escala de turvação de 0,5% escala McFarland (1×10^8 UFC/mL) (Probac, São Paulo, BR). Dessa suspensão foram adicionados 20 μL de cada amostras junto a 180 μL de meio de cultura LB, com oito repetições para cada condição testada. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com salina estéril. O biofilme foi fixado com 200 μL de metanol absoluto por 15 minutos e as microplacas foram secas por 16 horas a temperatura ambiente. A seguir, os poços foram corados com uma solução de cristal violeta 0,5% à temperatura ambiente por 5 minutos, lavados com

água destilada até o excedente de corante ser retirado, e as placas foram deixadas novamente para secar ao ar. Para solubilizar o cristal violeta, foi adicionado 200 µL de ácido acético glacial. A densidade óptica (DO) de cada poço foi determinada em leitor de microplaca em 570 nm (Stepanovic et al, 2004).

As cepas foram categorizadas comparando-se a DO do controle negativo e das amostras (Quadro 2), conforme descrito por Christensen et al. (1985).

Quadro 2: Classificação dos Microrganismos Formadores de Biofilme com Base na Densidade Óptica (DO).

Condição	$DO_{\text{biofilme}} < DO_{\text{c-}}$	$DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 2 \times DO_{\text{c-}}$	$2 \times DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 4 \times DO_{\text{c-}}$	$4 \times DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}}$
Categoria	Não formador de biofilme	Fraco formador de biofilme	Moderado formador de biofilme	Forte formador de biofilme

Fonte: Christensen et al. (1985), com modificações.

4.7 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O método utilizado foi de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antibiótico, utilizando o sistema automatizado Vitek®. Os antimicrobianos testados foram: amicacina, ciprofloxacina, colistina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim.

4.8 ESTATÍSTICA

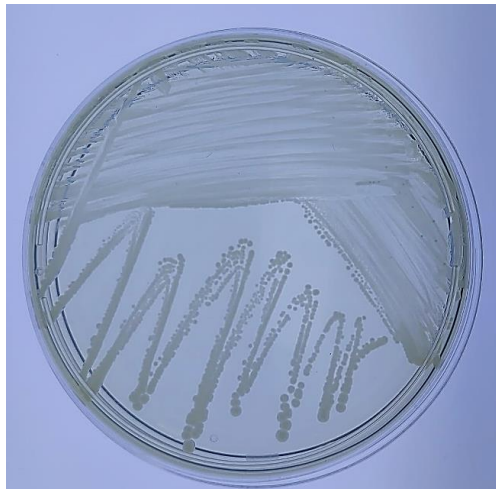
Os dados obtidos na caseinólise foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software* GraphPad Prism® 5.01. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância (*One-Way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Dunette, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras recebidas, após serem isoladas apresentaram as características de *A. baumannii* formando colônias planas, mucóides, de coloração branco-acinzentada com diâmetro de cerca de 1,5 mm, como exemplificado na figura 2.

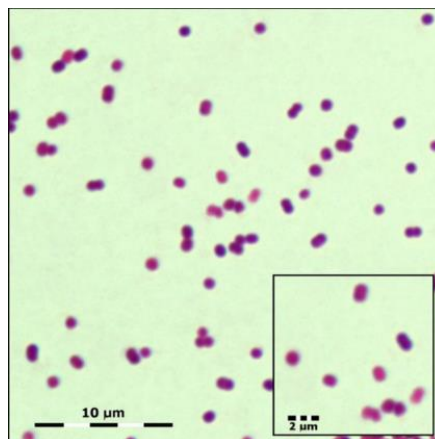
Figura 2 – Características morfológicas da colônia de *Acinetobacter baumannii*



Crescimento em Ágar nutriente (3% de ágar + 1,3% de caldo nutriente - Sigma) por 24 horas a 36°C.
Fonte: os autores (2023).

A coloração de Gram confirmou a principal característica desse patógeno: apresentar células cocobacilares Gram negativas e aparecendo na microscopia frequentemente dispostos como diplococos (figura 3).

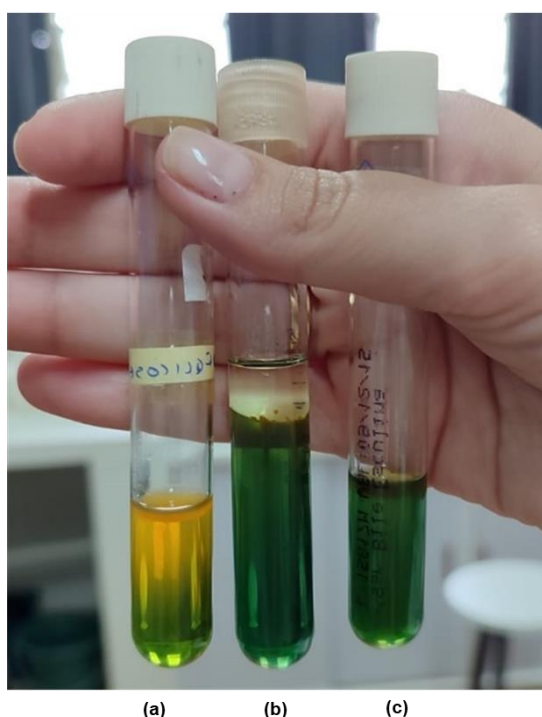
Figura 3: Coloração de Gram de uma cultura de *Acinetobacter baumannii*.



Aumento 1000x. Fonte: os autores (2024).

A. baumannii é facilmente isolado em culturas padrão, mas é relativamente não reativo em muitos testes bioquímicos comumente usados para diferenciar e identificar os bacilos Gram negativos (Munoz-Price *et al.*, 2008). Por esse motivo, foram realizados os testes de OF glicose, OF glicose anaeróbico e OF lactose. Todas as amostras apresentaram os resultados esperados (figura 4), onde o teste OF glicose é positivo, com a degradação desse açúcar e os testes OF glicose anaeróbico e OF lactose são negativos.

Figura 4: Teste bioquímico de degradação de glicose realizado em uma das amostras de *Acinetobacter baumannii*.



Em (a) temos OF glicose positivo; em (b) o teste OF glicose anaeróbico negativo; e em (c) o OF lactose negativo. Fonte: os autores (2022).

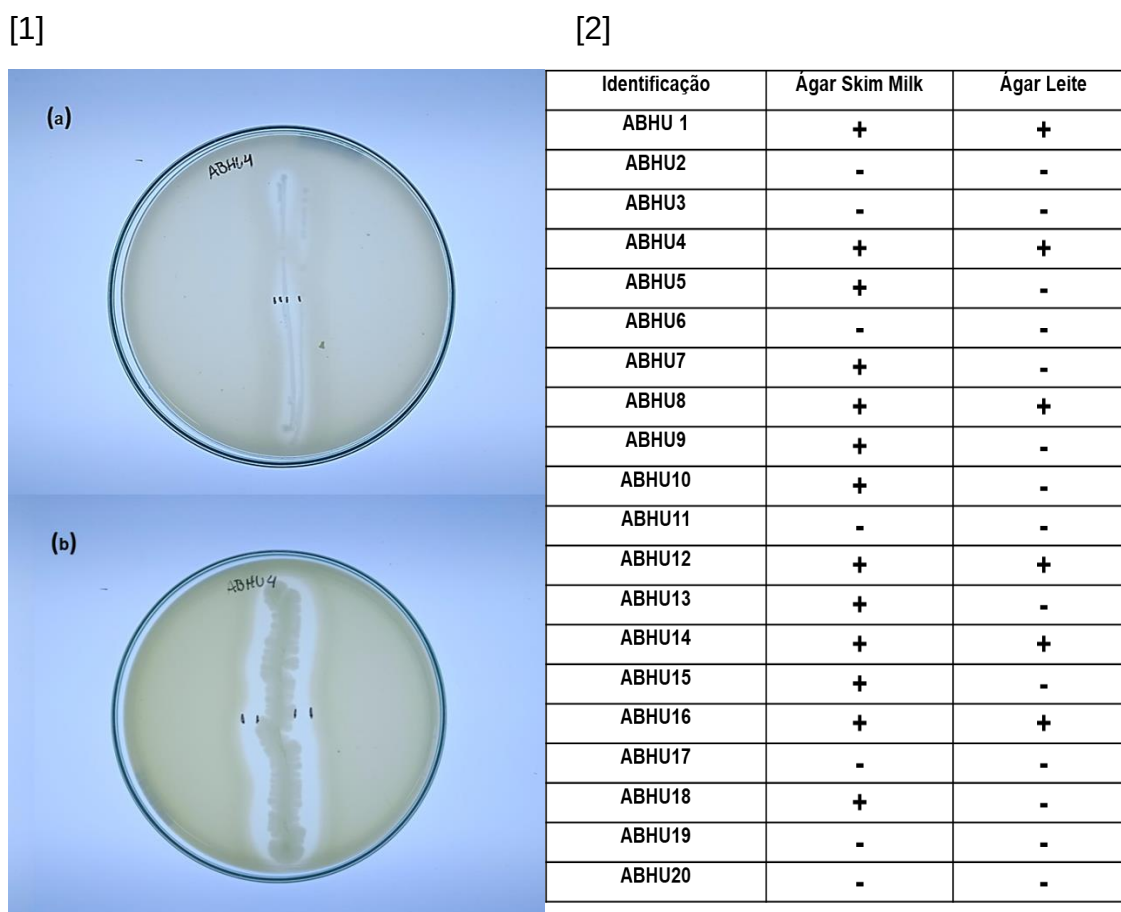
Todas as amostras cresceram a 44°C, o que confirma ser de fato *A. baumannii*, seguindo o padrão já descrito por Bouvet e Grimond (1987).

5.2 TRIAGEM DOS ISOLADOS PARA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Após a realização dos testes de morfotinturiais, bioquímicos e biológicos, foram realizados os testes de triagem para avaliar a degradação de caseína, utilizando os meios ágar leite e ágar skim milk. A figura 5 ilustra um dos resultados positivos para ambos os testes, evidenciando claramente o halo de degradação da caseína, como também apresenta a triagem de todas as amostras, indicando se são positivas ou

negativas para a formação do halo de degradação da caseína. Observou-se uma variação nos resultados de degradação, com apenas as amostras ABHU1, ABHU4, ABHU8, ABHU12, ABHU14 e ABHU16 apresentando halo de degradação em ambos os meios testados. Em resumo, 6 (30%) amostras demonstraram halo de degradação para ambos os meios de skim milk e ágar leite, enquanto 13 (70%) apresentaram essa característica em apenas um dos meios.

Figura 5: Triagem de cepas proteolíticas.



Em [1] temos a representação da formação de halo de degradação da caseína no ágar Skim milk (Painel A) e ágar leite (Painel B) para uma das amostras de *Acinetobacter baumannii*. Em [2] os resultados da triagem dos isolados de *Acinetobacter baumannii* para formação do halo de degradação da caseína, observados em ágar skim milk (A.S.M.) ágar leite (A. L.). Fonte: os autores (2023).

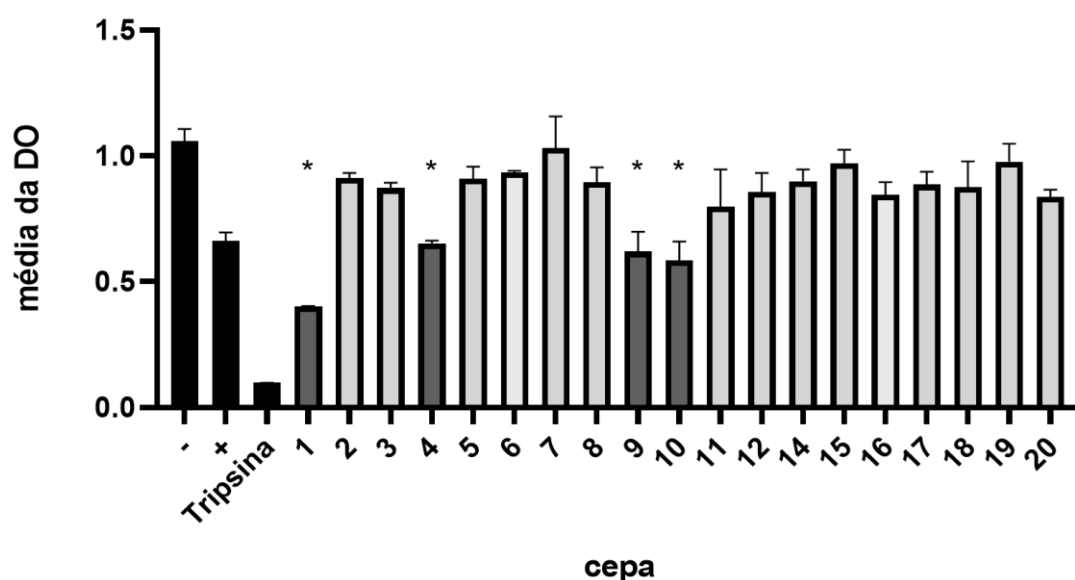
A partir dos resultados da triagem foi conduzido o ensaio de caseinólise para avaliar mais especificamente a degradação da caseína.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR CASEINÓLISE EM MEIO LÍQUIDO

A cepa ABHU13 foi perdida devido a um incidente durante o congelamento, resultando na exclusão dessa amostra dos ensaios subsequentes. Assim, a partir deste ponto, o estudo conta com um total de 19 amostras.

Os resultados do ensaio de caseinólise são apresentados na Figura 6, onde é observado que apenas as amostras ABHU1, ABHU 4, ABHU 9, ABHU 10 foram capazes de degradar eficientemente a caseína. No entanto, é evidenciada uma diferença entre as cepas e o controle negativo no gráfico, indicando a presença de degradação na reação, embora em menor intensidade.

Figura 6: Avaliação quantitativa da caseinólise.

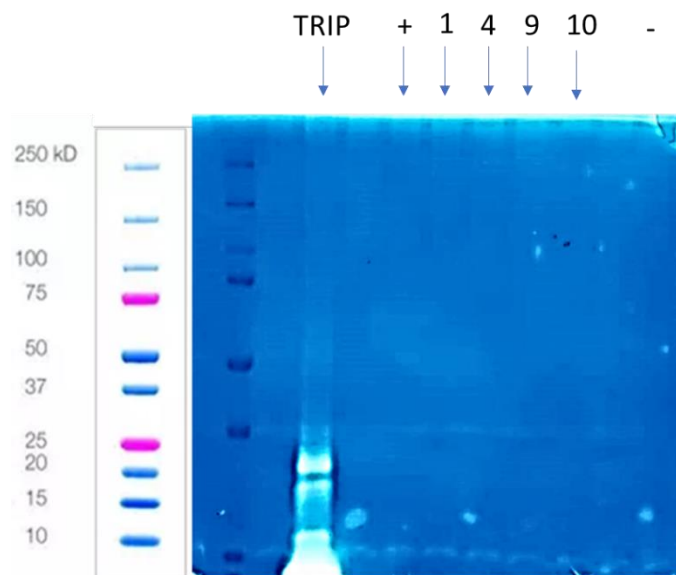


Os dados foram submetidos a análise estatística para avaliar as diferenças entre os grupos (-) e (+), bem como a média das triplicatas para cada cepa. Os resultados indicam diferenças significativas entre os grupos. Fonte: os autores (2023).

5.4 ZIMOGRAFIA DE PROTEASES

O zimograma revelou a presença de algumas bandas de atividade enzimática, para as amostras CTR+, ABHU1, ABHU4, ABHU9 e ABHU10, localizadas em aproximadamente em 25 kDa e 10 kDa. A banda em 10 kDa apareceu para as cepas testadas, esses resultados sugerem uma maior atividade nessa faixa enzimática e corroboram com os resultados observados na caseinólise em fase líquida.

Figura 7: Zimograma revelando a atividade enzimática em gelatina.



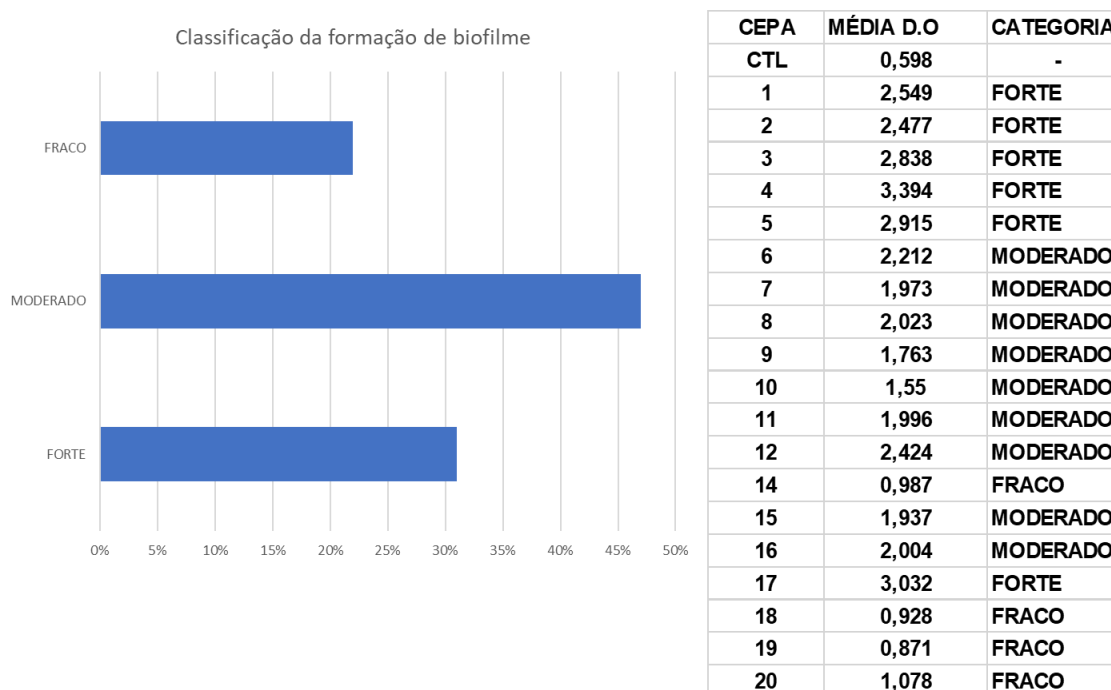
Resultados da zimografia do gel poliacrilamida 10% acrescido de 5% de gelatina, corado com comassie blue. Fonte: os autores (2024).

5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Na avaliação da formação de biofilme, as cepas foram classificadas em formadoras de biofilme forte, moderado, fraco e não formadoras de biofilme (quadro 2), após coloração com cristal violeta e solubilização do biofilme com ácido acético. A avaliação do perfil fenotípico de formação de biofilme dos isolados de *Acinetobacter baumannii* demonstrou que todos os 19 isolados analisados foram capazes de produzir biofilme com diferentes intensidades de aderência.

A média da Densidade Óptica (DO) das 19 cepas estudadas variou de 0,610 a 3,339. O ponto de corte da DO para o teste foi definido como a DO do controle negativo (DOc) que foi de 0,598. As cepas foram agrupadas em não formador ($DO < 0,598$), fraco ($0,598 < DO \leq 1,196$), moderado ($1,196 < DO \leq 2,392$) e forte ($DO > 2,392$). Observamos que todas as cepas foram capazes de formar biofilme, sendo 22% ($n = 4$) das cepas capazes de formar biofilme fraco, 47% ($n = 9$) biofilme moderado e 31% ($n = 6$) biofilme forte (figura 8).

Figura 8: Classificação das cepas de *Acinetobacter baumannii* segundo a sua capacidade de formar biofilme.



As cepas foram classificadas de acordo com as categorias definidas por Christensen et al. (1985) descritas na Seção de Materiais e Métodos (quadro 2). Fonte: os autores (2023).

5.6 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Todas as cepas de *A. baumannii* foram submetidos a testes de susceptibilidade a antimicrobianos através do método MIC e foram resistentes a todos os antibióticos testados, com exceção à Colistina. Portanto, as cepas podem ser classificadas como XDR, ou seja, extensivamente-droga-resistentes.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para oito diferentes antibióticos: amicacina, ciprofloxacina, colistina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim, contra dezenove cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*. A CIM para o antibiótico colistina foi de 1 µg/mL, demonstrando alta eficácia, enquanto para todos os outros antibióticos testados a bactéria demonstrou-se resistente (Quadro 3).

Quadro 3: Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de *Acinetobacter baumannii*.

Fármaco	CIM/Conc
Amicacina	>32

Ciproflaxacina	>2
Colistina	<=1
Gentamicina	>8
Imipenem	>8
Levofloxacina	>4
Meropenen	>32
Trimetoprim-Sulfametoxazol	>2/38

Valores mais baixos de CIM indicam maior eficácia do antibiótico contra a cepa correspondente. Dados obtidos por meio do sistema automatizado Vitek®. Fonte: os autores (2024).

6 DISCUSSÃO

Os fatores de virulência contribuem para a patogênese, possibilitando uma interação bem-sucedida entre patógeno e hospedeiro, com consequente colonização, bem como infecção. Além disso *A. baumannii* apresenta grande capacidade de sobrevivência sob condições ambientais variáveis por períodos prolongados e resistir a condições de dessecação devido a associação de diferentes mecanismos, como a produção de polissacarídeos capsulares, expressão de proteínas envolvidas na resistência aos antimicrobianos, de sistemas de efluxo, formação de biofilme (Favaro,2024).

Neste estudo, foi realizada uma análise de vinte isolados de *Acinetobacter baumannii*, com foco na liberação de proteases e na formação de biofilme, visando entender melhor os fatores de virulência deste patógeno. Esse patógeno é amplamente reconhecido por seu papel significativo em infecções hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), onde contribui para aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes.

A análise das amostras revelou que 75% eram provenientes de escarro endotraqueal, refletindo a predominância do trato respiratório como um importante sítio de infecção por *A. baumannii*. Este achado está alinhado com a literatura, que indica uma alta frequência de isolados respiratórios em UTIs (Ibrahim *et al.*, 2021; Rawson *et al.*, 2020). A identificação das cepas confirmou as características típicas de *A. baumannii*, o que reitera a eficácia dos métodos bioquímicos utilizados. A identificação correta das espécies é de suma importância para promover o aprimoramento dos conhecimentos relativos à epidemiologia das infecções causadas por essas bactérias e melhorar o entendimento sobre o surgimento de espécies patogênicas (Souza, 2022).

Os testes qualitativos de degradação proteolítica mostraram uma variabilidade entre as cepas, com 35% das amostras apresentando halos de degradação em ambos os meios de skim milk e ágar leite, enquanto 65% demonstraram esse padrão em apenas um meio. Este resultado sugere uma diversidade nas capacidades proteolíticas das amostras, o que pode estar relacionado às diferentes estratégias de virulência que as cepas utilizam para sobreviver e se proliferar no ambiente hospitalar. É importante observar que a utilização de leite como fonte de caseína para triagem pode gerar resultados ambíguos, devido à possibilidade de interferência de outras

substâncias (Levet-Jones, 2007). No entanto, os dados de zimografia corroboram a presença de enzimas proteolíticas nas amostras que mostraram atividade caseinolítica, confirmando a atividade proteolítica em pelo menos algumas das cepas estudadas (Fernandes et al., 2008).

A produção de protease microbiana é principalmente extracelular e é fortemente influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido (Kuddus et al., 2008). Cada tipo de micro-organismos apresenta seus próprios requisitos para obter a máxima produção de enzimas. É relatado que as condições de cultura que induzam a produção de protease são diferentes das condições de cultura que promovem o crescimento celular (Kasana et al., 2011)

A formação de biofilme é outro importante fator na virulência de *A. baumannii*. Os testes realizados revelaram que todas as cepas foram capazes de formar biofilmes, com 22% apresentando formação de biofilme fraco, 47% moderado e 31% forte. Estes resultados são consistentes com a literatura existente, que aponta a alta prevalência de formação de biofilme entre os isolados de *A. baumannii* (Babapour et al., 2016). A capacidade de formar biofilme está associada a uma maior resistência antimicrobiana e à persistência do patógeno, complicando o controle das infecções hospitalares.

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

A resistência à dissecação associada ao mecanismo de formação de biofilme favorece a colonização desse micro-organismo em equipamentos médicos e superfícies inanimadas, contribuindo para sua persistência no ambiente hospitalar e potencializando sua transmissão. A taxa de formação de biofilme em cepas de *A. baumannii* correspondeu a 80-91% e essa característica está relacionada com diversos fatores de virulência (Souza, 2022). A formação de biofilme é um importante fator de patogenicidade em diversas infecções nosocomiais relacionadas aos dispositivos médicos, sendo resultado da capacidade do organismo de resistir à desinfecção química e física aplicada. Esse fato tem sido uma característica chave na

patogenicidade de *A. baumannii*, especialmente em relação às infecções de âmbito intravascular e pneumonia associada à ventilação mecânica (Badave; Kulkarni, 2015).

A observação de resistência quase universal a antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, destaca a importância de compreender melhor os fatores de virulência, como a produção de proteases e a formação de biofilme. Embora algumas cepas tenham sido classificadas como XDR (extensivamente-droga-resistentes), outros estudos relatam uma variedade de perfis de resistência, o que indica a necessidade de investigações contínuas para entender completamente as interações entre a formação de biofilme, a resistência antimicrobiana e a patogenicidade. A compreensão desses mecanismos é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes para o controle e manejo de infecções causadas por *A. baumannii*, especialmente em ambientes hospitalares, onde a resistência a múltiplos antimicrobianos representa um desafio significativo para a saúde pública (Munoz-Price et al., 2008; Koneman et al., 2008).

O mais alarmante da capacidade do *A. baumannii* em acumular e expressar diversos mecanismos de resistência, é o surgimento de cepas resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, e a falta de novos agentes antimicrobianos em desenvolvimento (Munoz-price et al., 2008). Uma resistência quase universal a penicilina, ampicilina e cefalotina é descrita, e a maioria das cepas mostram-se resistentes ao cloranfenicol. Pesquisadores têm observado maior tendência à resistência aos aminoglicosídeos entre as espécies de *Acinetobacter*, bem como o aparecimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos, incluindo aquelas resistentes aos carbapenêmicos e estas são as espécies normalmente envolvidas em surtos hospitalares (Koneman et al., 2008).

No presente trabalho as cepas foram classificadas como XDR (extensivamente-droga-resistentes), trabalhos na literatura divergem desse dado, como por exemplo, Mendes (2019) que analisou o perfil de suscetibilidade das 26 amostras de *A. baumannii* a antimicrobianos. Todas as amostras do estudo apresentaram uma alta porcentagem de resistência antimicrobiana, com 80,7% (21/26) das cepas sendo classificadas como MDR e 7,7% (2/26) de cepas como PDR. O conhecimento do perfil de suscetibilidade das amostras, principalmente em relação a existência de outros mecanismos de resistência, é um dado importante para uma melhor avaliação da atividade antimicrobiana.

Sendo assim, cabe ressaltar a potencial contribuição desse estudo, uma vez que os resultados apresentados irão possibilitar a ampliação do conhecimento acerca dos fatores de patogenicidade apresentados por linhagens de *A. baumannii* isolados em pacientes hospitalizados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos fatores de virulência em *Acinetobacter baumannii* demonstrou a diversidade das características que contribuem para sua patogenicidade.

Os resultados deste estudo ressaltam a importância dos fatores de virulência como a produção de proteases e a formação de biofilmes na sobrevivência e persistência desse patógeno.

A predominância de cepas multirresistentes reforça a dificuldade no tratamento e controle de infecções associadas a este patógeno.

Esses achados destacam a complexidade dos mecanismos de virulência de *A. baumannii* e a importância de considerar esses fatores no manejo das infecções causadas por este patógeno.

REFERÊNCIAS

- AIDA, S. G. et al. Treatment outcomes of colistin-and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: an exploratory subgroup analysis of a randomized clinical trial. **Clin. Infect. Dis.**, v. 69, 2019.
- ALVES, M. M. **Avaliação da ocorrência de genes de resistência e virulência e perfil clonal de isolados clínicos do complexo *A. Baumannii*-*A. Calcoaceticus* obtidos a partir de hospitais da rede pública e privada de Maceió-AL.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2020.
- ANDRADE, L.; DARINI, A. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, 2017.
- ANTUNES, L. C. et al. Genome-assisted identification of putative iron utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypicamente diverse collection of clinical isolates. **Res. Microbiol.**, v. 1, 2011.
- ANTUNES, L. C. S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 3, 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, 2010.
- BABAPOUR, E. et al. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, 2016.
- BARBOSA, K. W. P. et al. Infecções por *Acinetobacter baumannii* e mecanismos de resistência: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 6, 2023.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Handbook of **Proteolytic Enzymes**. Academic Press, v. 2, 2004.
- BARROCAS, A. R. F. **Epidemiologia das beta-lactamases CTX-M, em bactérias Gram negativo.** Dissertação, Portugal, 2016.
- BECERRA, G. et al. Mecanismo de resistência a antimicrobianos em bactérias. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia**, v. 29, 2009.
- BENTANCOR, L. V. et al. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. **J. Bacteriol.**, v. 194, 2012.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, 1996.

BIER, K. E. S. et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. **Am. J. Infect. Control**, v. 38, 2010.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 140, 1987.

BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clin. Microbiol.**, v. 1, 1988.

CASTILHO, S. R. A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS ONE**, v. 12, 2013.

CHAGAS, P. G. T. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil.** Tese, 2015.

CHING, C. et al. RNA-Mediated cis Regulation in *Acinetobacter baumannii* Modulates Stress-Induced Phenotypic Variation. **J. Bacteriol.**, v. 199, 2017.

CHING, C. et al. Lon protease has multifaceted biological functions in *Acinetobacter baumannii*. **J. Bacteriol.**, v. 201, n. 2, 2019.

CLEMMER, K. M. et al. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**, v. 157, 2011.

COSGAYA, C. et al. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 66, 2016.

DA CUNHA, J. P. N. et al. **Avanços na terapia antimicrobiana em infecções causadas pela espécie *Acinetobacter baumannii*.** Tese, 2019.

DENISSEN, J. et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 244, 2022.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. **Crit. Care**, v. 11, 2007.

FÁVARO, L. dos S. **Estudo de determinantes de resistência aos antimicrobianos e de fatores de virulência em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.** Tese, 2024.

FERNANDES, S., & SÃO-JOSÉ, C. Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. **Viruses**.v.10, 2011.

FINLAY, B. J.; STEPHEN C. M.; COOPER, J.A. Microbial Diversity and Ecosystem Function. **Oikos**. v.80,1997.

FREITAS, E.; PEREIRA, L.; VILLAS BÔAS, M. H. S. Comparação entre métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes hospitalares. In: IV Bienal de Pesquisa da Fiocruz, 2004, Rio de Janeiro. **Anais da IV Bienal de Pesquisa da Fiocruz**, v. 1, 2004.

FRENCH, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, 2010.

GADDY, J. A. et al. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. **Infect. Immun.**, v. 80, 2012.

GARCIA-PATINO, M. G.; GARCIA-CONTRERAS, R.; LICONA-LIMON, P. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. **Front. Immunol.**, v. 8, 2017.

GARCIA-QUINTANILLA, M. et al. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Trends Microbiol.**, v. 21, 2013.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int. J. Antimicrob. Agents**, 2008.

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

GULATI, S. et al. Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. **Neurol. India**, v. 49, 2001.

GUR, E.; BIRAN, D.; RON, E. Z. Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria. How and when? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, 2011.

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

HAMZA, T. A. Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use. **Int. J. Chem. Biomol. Sci.**, v. 3, n. 1, 2017.

HOOD, M. I. et al. Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. **PLoS Pathog.**, v. 8, 2012.

HOOD, R. D. et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. **Cell Host Microbe**, v. 7, 2010.

SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical reviews in microbiology**, v. 37, 2011.

KRÖGER, C.; KARY, S.C.; SCHAUER, K.; CAMERON, A.D.S. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**. v. 8, 2017.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. Purification and properties of cold-active metalloprotease from *Curtobacterium luteum* and effect of culture conditions on production. *Chin. J. Biotechnol.*, v. 24, 2008.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Adv.**, v. 17, 1999.

KUMAR, S. et al. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, 2012.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, 2003.

KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. **Pathogens**, MDPI, v. 1, 2021.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, 2017.

LEITÃO, J. H. Microbial virulence factors. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, 2020.

LEVETT-JONES, T. L. Facilitating reflective practice and self-assessment of competence through the use of narratives. **Nurse Educ. Pract.**, v. 7, 2007.

LIMA, C. et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. **Biochem. Eng. J.**, v. 43, 2009.

LIVERMORE, D. M. Introduction: The challenge of multiresistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, 2007.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. Acesso em: 13 maio 2024.

LUCIDI, M. et al. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. **Virulence**, v. 15, 2023.

MACGREGOR, D. G. et al. Group S8A serine proteases, including a novel enzyme cadeprin, induce long-lasting, metabotropic glutamate receptor-dependent synaptic depression in rat hippocampal slices. **Eur. J. Neurosci.**, v. 26, 2007.

MAEDA, H. Role of microbial proteases in pathogenesis. **Microbiol. Immunol.**, v. 40, 1996.

MAGIORAKOS, A. P. et al. The rise of carbapenem resistance in Europe: just the tip of the iceberg? **Antimicrob. Resist. Infect. Control**, v. 2, 2013.

MARQUART, M.E. Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. **Virulence**, v.12, 2021.

MARR, A. K. *et al.* The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. **Microbiology**, v. 153, 2007.

MATKAWALA, F. *et al.* Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World J. Microbiol.* **Biotechnol.**, v. 37, 2021.

MELO, C. C. **Aspectos fenotípicos e moleculares de isolados de *Acinetobacter baumannii* relacionados à infecção nosocomial.** Dissertação, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2014.

MENDES, R. F. V. **Efeito de derivados de 1,10-fenantrolina sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* produtoras de carbapenemases.** Tese, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, 2019.

MOORE, J. L. *et al.* Imaging mass spectrometry for assessing temporal proteomics: analysis of calprotectin in *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. **Proteomics**, v. 14, 2014.

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

MURI, M. F. E. *et al.* Hydroxamic Acids as pharmacological agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, 2002.

MURRAY, P. R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. **ASM Press**, v. 9, 2007.

MURRAY, C. K. *et al.* Bacteriology of war wounds at the time of injury. **Mil. Med.**, v. 171, 2006.

NEMEC, A. *et al.* *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 65, 2015.

OLIVEIRA, Maria Walcleanes Magalhães de. Avaliação do perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência em bactérias gram-negativas isoladas de pacientes com COVID-19 assistidos em um hospital terciário da região norte do Ceará. 2024.

PELEG, A. Y. *et al.* The success of *Acinetobacter* species: genetic, metabolic and virulence attributes. **PLoS One**, v. 7, 2012.

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

PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 5, 2007.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 8, 2002.

POLLARO, L.; DIDERICH, P.; ANGELINI, A.; BELLOTTO, S.; WEGNER, H.; HEINIS, C. Measuring net protease activities in biological samples using selective peptidic inhibitors. *Analytical biochemistry*, v. 427, 2012.

PONTES, V.M.O.; MENEZES, E.A.; CUNHA, F.A.; ÂNGELO, M.R.F.; SALVIANO, M.N.C.; OLIVEIRA, I.R.N. Perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos nas unidades de terapia intensiva e semi-intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 38, 2005.

POOLE, K. Resistance to β -lactam antibiotics. *CMLS, Cell. Mol.* v. 61, 2004.
 QI LIHUA, Qi LiHua, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2016.

QUEIROZ, C.; SOUSA, A. C. B. de. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos / Production of hydrolytic enzymes by filament fungi in different solid substrates. *Brazilian Journal of Development.* v. 6, n. 7, p. 51849–51860, 2020.

RAO, R.S., KARTHIKA, R.U., et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26, 2008.

RAWSON, T.M.; MING, D.; AHMAD, R. et al. Antimicrobial use, drug resistant infections and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v.18, 2020.

RICE, G.; E TSATAS, D.; BAKER, M. S. Differential expression of proteases in human gestational tissues before, during and after spontaneous-onset labour at term. *Reproduction*, v. 116, 1999.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clinical microbiology and infection*, v. 14, 2008.

RUMBO, C; FERNÁNDEZ-MOREIRA EMERINO, M; POZA, M; MENDEZ, J; A, SOARES, N.C; MOSQUERA A; CHAVES, F; BOU, G. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* v.55, 2011.

SANSEVERINO, I.N, et al. State of the Art on the Contribution of Water to *Antimicrobial Resistance*. v.10, 2018.

SARMENTO, V. L. F. et al. Avaliação do potencial proteolítico de bactérias isoladas do solo de Iranduba. *Research, Society and Development*, v. 10, 2021.

SHAPIRO, J. A.; WENCEWICZ, T. A. Acinetobactin isomerization enables adaptive iron acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-triggered siderophore swapping. **ACS infectious diseases**, v. 2, 2016.

STEPANOVIĆ S, CIRKOVIĆ I; et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol.**v,38, 2004.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; MASTROLORENZO, A. Bacterial proteases: current therapeutic use and future prospects for the development of new antibiotics. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 11, 2001.

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

TOUCHON, M; CURY, J; YOON, E.J; KRIZOVA, L; CERQUEIRA, G. The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences, **Genome Biology and Evolution**, v. 6,2014.

VISHVANATH, T., MONALISA T., Phosphoproteomics as an emerging weapon to develop new antibiotics against carbapenem resistant strain of *Acinetobacter baumannii*,**Journal of Proteomics**. v.112, 2015.

WAACK, U. et al. Cpaa is a glycan-specific adamalysin-like protease secreted by *acinetobacter baumannii* that inactivates coagulation factor xii. **mBio**, v. 9. 2013.
WINN, Washington C. et al. Koneman: diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. Buenos Aires: **Médica Panamericana**, 2008.

YANG, C.H.; SU, P.W.; MOI, S.H. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype Phenotype Correlation. **Molecules**, v.24, p.1-12, 2019.

ZIMMER, K. R., et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista liberato**. v.10, 2009.

JARIYARATTANARACH, P. et al. Novel D-form of hybrid peptide (D-AP19) rapidly kills *Acinetobacter baumannii* while tolerating proteolytic enzymes. **Sci. Rep.**, v. 12, 15852, 2022.