



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO IN VITRO DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA
HUMANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM, AMICACINA E
COLISTINA EM ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES de *Acinetobacter
baumannii***

Recife

2020

FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO IN VITRO DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA
HUMANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM, AMICACINA E
COLISTINA EM ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Area de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-Orientadora: Dra. Dyana Leal Veras

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- L732a Lima, Fernanda Cristina Gomes de.
Avaliação da ação *in vitro* da imunoglobulina intravenosa humana isolada e em combinação com meropenem, amicacina e colistina em isolados multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* / Fernanda Cristina Gomes de Lima. – 2020.
113 f.: il. tab.; 30 cm.
- Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCM.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Imunoglobulinas Intravenosas. 3. Anti-Infeciosos. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Imunofluorescência Indireta. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.
- 618.9883 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-098)

FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO IN VITRO DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA
HUMANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM, AMICACINA E
COLISTINA EM ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 14/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Beatriz Sotero Siqueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Glaucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira (Examinador Externo)
Secretaria de Educação de Pernambuco (SEE-PE)

Dedico especialmente a todos que compõem minha equipe de trabalho (LBCM/ME),
que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão e o sucesso do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida, pelas oportunidades concedidas, pelo conforto nos momentos de tristezas e inquietações, por me conduzir sabiamente nos momentos de dúvidas e desespero, por colocar em minha vida pessoas tão especiais que hoje me cercam. Por me permitir ser quem hoje sou e por me dar forças para nunca desistir dessa batalha.

Agradeço a Divindade superior, aos deuses e guias espirituais de todas as fés e religiões, aos espíritos de luz que caminham entre nós, a energia e força do universo que nos permeiam. A beleza, a cura, a vitalidade e a influência da natureza e suas forças sobre minha vida. Ao sagrado feminino que há em mim, que me conecta a verdadeira essência do que sou, que vai além da percepção do individual a consciência coletiva.

Agradeço a Marcelo Assis por todo apoio e companheirismo durante o longo processo da minha pós-graduação.

A minha família, minha mãe (Aldilene Gomes), meu pai (Fernando Lima), meu padrasto (Osman), aos meus avós (Dona Tonha e Zé do Foto), meus irmãos (Fernando Filho e Luciana Lima) e a minha prima (Adriane Gomes) que nunca deixaram de me apoiar e amar nessa jornada tão árdua e difícil que é a pós-graduação. Amo todos vocês.

Aos meus orientadores Luiz Alves, Fabio Brayner e Dyana Leal por terem me acolhido e escolhido para fazer parte do LBCM/ME, por serem meus guias científicos.

Nunca poderei deixar de agradecer, a uma das minhas melhores amigas, Grasielle Vaz, que estava comigo, lá no início da minha iniciação científica, me ajudou e me ensinou a dar meus primeiros passos nessa jornada. E tal companheirismo e ensinamentos transcenderam a barreira do profissional, se tornando uma bela e duradoura amizade.

Ao *team* Bactéria, Jorge, Catarina e Everton que foram meus pilares dentro do laboratório. Sempre companheiros, me ajudando com experimentos, discussões científicas e com nossa rotina na bacteriologia.

Um muito obrigado mais que especial, ao meu grande amigo Jorge (o REI da ABNT), por nunca me deixar sozinha no laboratório quando eu tinha experimentos a fazer, não se importando com os horários (muitas vezes até tarde), por fazer parte de minha vida, não só como colega de trabalho, mas também como um irmão, uma pessoa que admiro e respeito grandemente. Enfim, uma amizade que levarei para toda vida. Eu sempre digo a ele que ele é meu migo maravilhosamente insuportável e ele sempre responde (se achando), dizendo que é insuportavelmente maravilhoso, vou confessar, mas só dessa vez, concordo com você migo Jorge.

As colaborações realizadas com os amigos Amanda Vasconcelos e Alberon Araújo, que me ensinaram e ajudaram muito, ensinando-me técnicas novas, discutindo resultados e métodos científicos. E por serem profissionais competentes e responsáveis, a quem posso me espelhar.

A cada membro que já fez parte ou compõe o laboratório LBCM/ME, que sempre estavam e estão aptos, se dispondo a ajudar uns aos outros.

Aos amigos que já cumpriram seu ciclo no LBCM e hoje trilham uma nova jornada. São eles, Carmelita de Lima Rosa, Olavio Campos, Amanda Aliança, Catarina de Freitas, Eduarda Manguiera, Iany França, Everton Moraes, Wellington Braz, Evelline Azevedo, Gladston Rocha, Leandro Seara, Camila Queiroz, a xará Fernanda Dias e a Aparecida Seabra. Cada um de vocês contribuiu direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional e pessoal que me encaminhou para a conclusão deste trabalho.

Agora, o meu muito obrigado vai para os amigos do “É luta na terra” atual, aos amigos de batalhas diárias Nairomberg Portela, Karla Ribeiro, Thaynara Millena, Anderson Silva, Rubens Rocha, Gabriel Gazzoni e Tainá Santos. Agradeço também ao amigo Elverson Soares, que apesar de não estar mais vinculado ao LBCM, sempre está conosco e fará parte eternamente dos *teens LBCM*, ao Prof. Dr. Antônio Sergio (Serginho) e Ayug Lemos (uma aquisição inestimável para mim).

Agradeço as minhas amigas do BIOCTETO Jessika Pereira, Danielle Melo, Elis Dionísio, Marília Tenório, Marília Rodrigues, Eliete Cristina e Elidiane Fonseca. Juntas, iniciamos nossa jornada de aprendizado no curso bacharelado em Ciência Biológicas da UPE, contribuímos uma para a formação das outras e hoje continuamos unidas por um lindo laço de fraternidade e irmandade.

A todos os funcionários da FIOCRUZ-PE/IAM e LIKA-UFPE, especialmente a Cris, secretária do departamento da parasitologia, que sempre está disposta a nos ajudar a resolver questões burocráticas da instituição, as equipes de funcionários que já passaram pelo departamento desde quando entrei para a parasitologia até os dias atuais. Sendo estes, a equipe da esterilização, ao primeiro Edison que fez parte do setor, a dona Rita, que aos poucos conseguimos conquistar seu sério coração, ao senhor Nelson, sempre simpático e prestativo, e ao segundo e atual Edison, que se tornou um grande amigo sempre nos ajudando com muita simpatia e dedicação, sem o serviço dele, assim como o resto da equipe do setor, nosso trabalho não seria possível.

Aos amigos dos serviços gerais do departamento da parasitologia (anteriormente Valzinha e Janilton, atualmente Dona Fátima e Cleide), e no LIKA a guerreira Verinha e

Edison, todos sempre presentes, dispostos, facilitando e arrumando as coisas para que possamos realizar nosso trabalho. Um muito obrigado, a equipe de seguranças do IAM que zelam pela nossa segurança e muitas vezes, mesmo sem ter obrigação nos acompanham até o estacionamento, se preocupando se alguém vai nos buscar ou se estamos de carro. Agradeço também as meninas da recepção, Beth e Lu que sempre nos recebem com um sorriso no rosto e com um animador BOM DIA (muitas vezes, ouvi-lo melhorou o meu dia).

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Em especial, ao Sr. Walter que sempre está disposto a ajudar aos alunos da pós.

A CAPES pelo auxílio financeiro e pela concessão da minha bolsa.

Ao Instituto de Aggeu Magalhães (IAM), ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) e ao LIKA por toda a estrutura disponível, que proporcionou o desenvolvimento deste projeto.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste projeto.

“A persistência é o menor caminho do êxito” (CHAPLIN, 1997, p. 118).

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista associado ao aumento de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS). O uso combinado de antimicrobianos é uma alternativa para o tratamento de infecções por *A. baumannii* multidroga-resistentes (MDR), contudo nem sempre eficazes, por apresentarem efeitos colaterais e toxicidade para as células, sendo necessárias alternativas para o tratamento. Estudos mostram resultados promissores da terapia empírica com preparações imunoglobulina intravenosa (IGIV) e antimicrobianos para infecções bacterianas, utilizando a ação direta da IgG, invés da reposição do sistema imunológico. O objetivo deste estudo foi verificar, em isolados clínicos de *A. baumannii*, a ação da combinação de antimicrobianos (meropenem, amicacina e colistina) e descrever as possíveis alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* pela IGIV com e sem soro humano em associação com os antimicrobianos. A Concentração Inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos foi determinada em dez isolados de *A. baumannii*, seguida pela análise por checkerboard. Quatro isolados foram selecionados e submetidos à 4mg/mL de IGIV isoladamente e em combinação a diferentes sub-CIM sinérgicas dos antimicrobianos. Posteriormente, foram processados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi determinada a taxa de fagocitose e a capacidade de ligação da IGIV à célula bacteriana para dois isolados da *A. baumannii* submetidos à IGIV humana isoladamente e em combinação com diferentes sub-CIM sinérgicas dos antimicrobianos. Por fim, estes isolados foram submetidos à IVIG e aos antimicrobianos, juntamente com soro humano e processados para MEV. Nove isolados exibiram resistência ao meropenem, dois isolados foram intermediários à colistina e quatro isolados apresentaram susceptibilidade intermediária para amicacina. Foram observadas concentrações sinérgicas em cinco dos dez isolados avaliados nas combinações de meropenem/amicacina e meropenem/colistina. Quando submetidas à IGIV e a sub-CIM de meropenem, amicacina e colistina, as células bacterianas apresentaram alterações morfológicas, como alongamento celular, rugosidade de membrana, ruptura celular, divisão celular incompleta, presença de “bolhas” na superfície celular e “depressão” na membrana. Não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de fagocitose. Os isolados bacterianos também apresentaram alterações morfológicas quando submetidos à IGIV/Soro humano isoladamente e em combinação com antimicrobianos, como: alteração na forma, enrugamento, depressão da membrana e principalmente ruptura celular com extravasamento de material citoplasmático. Os isolados apresentaram, visualmente, diferença na ligação da IGIV à célula bacteriana, com maior fluorescência no isolado sensível ao

meropenem, amicacina e colistina. Entre os tratamentos, não foram observadas diferenças na ligação da IGIV à célula bacteriana. A ação combinada da IGIV com meropenem, amicacina e colistina frente isolados MDR de *A. baumannii* causa diversos danos à célula bacteriana, e quando associados ao soro humano, pode ser verificada uma grande destruição de células. Possibilitando observar *in vitro* que a IGIV associada ao meropenem, amicacina e colistina pode ser alternativa promissora no combate de infecções por *A. baumannii* MDR, visto danos morfológicos causados, similares aos danos provocados pelas combinações de antimicrobianos, além de IVIG não apresentar efeitos colaterais e toxicidade as células humanas. Assim, estes dados dão suporte à continuação do uso empírico e estimula análises *in vivo* com IGIV em busca de novas opções terapêuticas para IRAS.

Palavras-chaves: *Acinetobacter baumannii*. Imunoglobulinas Intravenosas. Anti-Infeciosos. Microscopia Eletrônica de Varredura. Imunofluorescência Indireta.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen associated with Health Care Related Infections (HAI). The combined use of antimicrobials is an alternative for the treatment of infections by multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR), however they are not always effective, presenting side effects and toxicity to human, requiring alternatives for the treatment. Studies have shown promising results from empirical therapy with intravenous immunoglobulin (IVIG) and antimicrobial for bacterial infections, using the direct action of IgG. The objective of this study was to verify, in clinical isolates of *A. baumannii*, the combined action of antimicrobials (meropenem, amikacin and colistin) and to describe the possible ultrastructural changes induced in vitro by IVIG with and without human serum in association with antimicrobials. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the antimicrobials was determined in ten isolates of *A. baumannii*, followed by the analysis by checkerboard. Four clinical isolates were selected and submitted to 4mg/mL of IGIV alone and in combination with different synergistic sub-MICs of the antimicrobials. They were processed for scanning electron microscopy (SEM). The rate of phagocytosis by and the capacity to bind IGIV to the bacterial cell were determined for two isolates, submitted to human IGIV alone and combination with synergistic sub-MICs of antimicrobials. These isolates were subjected to IVIG and antimicrobials, now together with human serum, they were processed for SEM. Nine bacterial isolates exhibited resistance to meropenem, two isolates were intermediate to colistin and four isolates showed intermediate susceptibility to amikacin. Synergistic concentrations were observed in five of the ten isolates in the combinations of meropenem/amikacin and meropenem/colistin. When subjected to IVIG and sub-MIC of meropenem, amikacin and colistin, bacterial cells showed several morphological changes, such as cell elongation, membrane roughness, cell rupture, incomplete cell division, presence of “bubbles” on the cell surface and “depression” on the membrane. There was no statistically significant difference for the phagocytosis rates. Bacterial isolates also showed changes in cell morphology when subjected to IVIG/human serum alone and in combination with antimicrobials, such as: change in shape, wrinkling, membrane depression and mainly cell rupture. The isolates visually showed a difference in the binding of IGIV to the bacterial cell, with greater flowering in the isolate sensitive to meropenem, amikacin and colistin. Among the treatments, no differences were observed in the binding of IGIV to the bacterial cell. The combined action of IGIV with meropenem, amikacin and colistin against MDR isolates from *A. baumannii* causes several damages to the bacterial cell, and when associated

with human serum, a great destruction of cells can be verified. In addition, enabling to observe in vitro that IGIV associated with meropenem, amikacin and colistin is highly promising alternative to fight infections by *A. baumannii* MDR, given the morphological damage caused, which was similar to the damage caused by the combinations of antimicrobials, in addition to the fact that IVIG has no side effects and no toxicity to human cells. These data support the continuation of empirical use and stimulate in vivo analyzes with IGIV to search for therapeutic options for HAIs.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Intravenous Immunoglobulins. Anti-Infective Agents. Scanning Electron Microscopy. Indirect Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS

TESE

FIGURA 1 –	Estrutura celular de bactérias Gram-negativas.....	22
FIGURA 2 –	Parede celular bacteriana.....	23
FIGURA 3 –	<i>Acinetobacter baumannii</i> cultivado em ágar MacConkey.....	26
FIGURA 4 –	Estrutura química dos aminoglicosídeos.....	29
FIGURA 5 –	Estrutura química dos carbapenêmicos.....	31
FIGURA 6 –	Estrutura química das polimixinas.....	32
FIGURA 7 –	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos por <i>Acinetobacter baumannii</i>	34
FIGURA 8 –	Imunidade humana a infecções bacterianas.....	40
FIGURA 9 -	Organograma da seleção dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	47
FIGURA 10 -	Organograma dos grupos experimentais.....	48

ARTIGO 1

FIGURA 1 -	Eletromicrografia de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 808.....	62
FIGURA 2 -	Eletromicrografia de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 119.....	64
FIGURA 3 -	Eletromicrografia de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 322.....	66
FIGURA 4 -	Eletromicrografia de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 165.....	68

ARTIGO 2

FIGURA 1 -	Taxa de fagocitose com os isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	86
FIGURA 2 -	Avaliação do tratamento na Taxa de fagocitose com os isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	86
FIGURA 3 -	Eletromicrografias de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 808.....	88
FIGURA 4 -	Eletromicrografias de <i>Acinetobacter baumannii</i> do isolado 119.....	90
FIGURA 5 -	Micrografias de imunofluorescência do isolado 808 de <i>Acinetobacter baumannii</i> com anti-IgG conjugada com FITC.....	92
FIGURA 6 -	Micrografias de imunofluorescência do isolado 119 de <i>Acinetobacter baumannii</i> com anti-IgG conjugada com FITC.....	93

LISTA DE TABELA

TESE

TABELA 1 – Caracterização e perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	45
TABELA 2 – Seleção dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	48

ARTIGO 1

TABELA 1 – Caracterização e Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> provenientes de hospitais públicos da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014.....	56
TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> para os antimicrobianos meropenem, colistina e amicacina.....	59
TABELA 3 – Análise das associações de antimicrobianos por checkerboard nos isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i>	60
TABELA 4 – Seleção dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	60

ARTIGO 2

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> e concentrações sub-sinérgicas para os antimicrobianos.....	83
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BHI	Infusão de coração e cérebro, do inglês <i>Brain heart infusion</i>
AmpC	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CDT	<i>Clostridium difficile toxin</i>
CIM	Concentração Inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Laboratoriais Clínicos, do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMS	Colestimetato de sódio
CTX-M	Cefotaximase, primeiramente isolada em Munich
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ERIC-PCR	Consenso intergênico repetitivo enterobacteriano – Reação em Cadeia de Polimeras, do inglês <i>Enterobacterial Repetitive Intergenics Consensus-Polymerase chain reaction</i>
ESBLs	β-Lactamases de espectro estendido, do inglês extended spectrum β-lactamases
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
IgG	Imunoglobulina G
IMP	Impipenemase
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITU	Infecções do trato urinário
IGIV	Imunoglobulina G Intravenosa humana
Kb	Quilo base
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarideo
M	Molar
MBLs	metalo-β-lactamases
ml	Mililitro

Mm	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> suscetível a meticilina
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NO	Oxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxid</i>
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteína Ligadora de penilina, do ingles <i>Penicillin binding protein</i>
PCR	Reação em cadeia da polymerase, do ingles <i>Polymease Chain Reaction</i>
PFGE	Eletroforese de campo-pulsado, do inglês <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
Ph	Potencial de Hidrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SPM	São Paulo Metallo- β -lactamase
Sub-CIM	Sub-Concentração Inibitória Mínima
TBE	Tris-borato EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTIs	Unidades de Terapias intensivas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	MORFOLOGIA E ESTRUTURA DE BACTÉRIAS GRAM- NEGATIVAS.....	22
2.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24
2.3	TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE INFECCÕES POR <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
2.3.1	Aminoglisídeos.....	29
2.3.2	Carbapenêmicos.....	30
2.3.3	Polimixinas.....	32
2.4	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	33
2.4.1	Resistência a carbapenêmicos.....	35
2.4.2	Resistência a colistina.....	36
2.4.3	Resistência a aminoglicosídeos.....	37
2.5	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS BACTERIANAS.....	38
2.6	IMUNIDADE HUMANA A INFECCÕES BACTERIANAS....	39
2.7	IMUNOGLOBULINA G INTRAVENOSA HUMANA.....	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS.....	45
4.2	ANTIMICROBIANOS E IGIV.....	45
4.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	46
4.4	CHECKERBOARD.....	46
4.5	SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	47
4.6	PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS.....	48
4.7	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA MEV.....	49
4.8	SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA A TAXA DE	

	FAGOCITOSE, MEV COM SORO HUMANO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	49
4.9	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO.....	49
4.10	TAXA DE FAGOCITOSE.....	50
4.11	SORO HUMANO.....	50
4.12	ULTRAESTRUTURA DE <i>Acinetobacter baumannii</i> SUBMETIDAS À IGIV, ANTIMICROBIANOS E SORO HUMANO.....	50
4.13	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	50
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
4.15	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	51
4.16	FINANCIAMENTO.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	ARTIGO 1 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS CAUSADAS PELA COMBINAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA COM MEROPENEM, AMICACINA E COLISTINA EM <i>Acinetobacter baumannii</i> MULTIDROGA-RESISTENTES.....	52
5.2	ARTIGO 2 - AÇÃO <i>IN VITRO</i> DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA HUMANA EM COMBINAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS E SORO HUMANO FRENTE ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	79
6	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE A – TCLE.....	107
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1.....	110
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2.....	112

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno hospitalar, sendo considerado um microrganismo oportunista frequentemente encontrado causando as infecções nas últimas décadas, levando ao aumento da morbidade e mortalidade por Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) (FUJIKURA et al., 2016; FAM et al., 2017; AHMED et al., 2019).

Dentre as infecções associadas à *A. baumannii*, incluem: pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário, meningite, entre outras, além de estar envolvido em infecções através da contaminação de equipamentos hospitalares (MARTINS; BARTH, 2013; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; AHMAD et al., 2019).

Devido ao frequente isolamento de *A. baumannii* de pacientes hospitalizados e sua grande capacidade de causar graves infecções, esta espécie bacteriana recebeu o *status* de "patógeno humano chave". No entanto, quando se refere aos fatores de virulência das cepas de *A. baumannii*, não foi relatada a capacidade de produzir toxinas potencialmente virulentas, sugerindo que o sucesso em causar infecções está vinculado a estratégia de colonizar o ambiente e resistir à ação de agentes antimicrobianos (TAITT et al., 2014; AHMED et al., 2019).

A alta incidência de isolados multidroga-resistentes (MDR) de *A. baumannii* torna desafiador o tratamento de infecções causadas por esta espécie, devido à diminuição das opções terapêuticas disponíveis, pois, além do aumento da taxa de morbimortalidade, ainda eleva os gastos financeiros com a assistência a saúde, visto à permanência prolongada do paciente em instituições de saúde e ainda elevando o risco de entrada em uma era pós-antibiótica (RUSSO et al., 2010; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; TAITT et al., 2014.; LEITE et al., 2015; FUJIKURA et al., 2016; SALLAM; ABOU-AISHA; EL-AZIZI, 2016; FAM et al., 2017; AHMAD et al., 2019).

Com o constante aumento da resistência de isolados de *A. baumannii* impossibilita que haja um comportamento clínico padrão para o tratamento destas infecções (MARAGAKIS; PERL, 2008). Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos compõem o arsenal terapêutico desde seu descobrimento na década de 1940 (OLIVEIRA et al., 2006), sendo, amicacina a apresentar maior espectro de ação nesta classe. Podendo ser usado em infecções por bacilos Gram-negativos resistentes à gentamicina e na terapia empírica de IRAS por *A. baumannii* (ANVISA, 2007; NCBI, 2019). Os carbapenêmicos são comumente considerados

os antimicrobianos mais seguros e eficientes, assumindo um grande papel no tratamento de graves infecções causadas por bactérias MDR (ARROYO et al., 2011; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017). Contudo, o aparecimento de isolados resistentes aos carbapenêmicos tem reduzido consideravelmente as opções terapêuticas atuais (ZARRILLI et al., 2009; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017).

Estudos têm proposto a combinação de antimicrobianos com diferentes ações sob a célula bacteriana, para tratamento de infecções. Sendo demonstradas alterações morfológicas induzidas *in vitro* em células bacterianas de diferentes espécies submetidas à sub-concentrações inibitórias mínimas (sub-CIM) de antimicrobianos (DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010; VERAS et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016).

Os beta-lactâmicos, como carbapenêmicos, em combinação com outra classe de antimicrobianos, ainda tem mostrado eficiência no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* com baixa a moderada resistência (FOURNIER; RICHET, 2006). No entanto, para cepas pan-resistentes, a colistina pode ser utilizada como fármaco de escolha, principalmente em infecções mais severas (FAM et al., 2017). Porém, a alta taxa de pacientes apresentando efeitos colaterais, principalmente o comprometimento da função renal, tornou inadequado o uso das polimixinas. Aumentando assim, a necessidade de novas opções para o tratamento de infecções por isolados resistentes de *A. baumannii* (FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; OMS, 2018; SERIO et al., 2018, VAARA, 2019).

Neste contexto de alta incidência de isolados MDR de *A. baumannii*, diversos estudos têm proposto novas estratégias de tratamento para estas infecções. O tratamento empírico com imunoglobulina G intravenosa humana (IGIV) associada aos antimicrobianos para infecções bacterianas vem sendo utilizado e tem revelado resultados promissores, podendo ser uma forte alternativa para a terapia de infecções resistentes. (SALCEDO et al., 1997; LAUPLAND, 2002; TANAKA et al., 2010).

Um estudo *in vitro* utilizando uma cepa *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos comprovou que a IGIV ocasionou alterações na morfologia celular de forma mais rápida e intensa, como a formação de esferoplastos, perda de material citoplasmático e coagulação das células bacterianas, em comparação à submissão da mesma cepa ao meropenem (TANAKA et al., 2010). No entanto, ainda há dúvidas sobre a atividade biológica *in vitro* da associação de antimicrobianos e IGIV sobre isolados MDR de *A. baumannii*.

Assim, este estudo visa contribuir dando suporte à terapia combinada da IGIV humana com antimicrobianos, diminuindo os conflitos referentes à ação e uso destas preparações em infecções bacterianas, como alternativa terapêutica para tratamento de IRAS causadas por *A.*

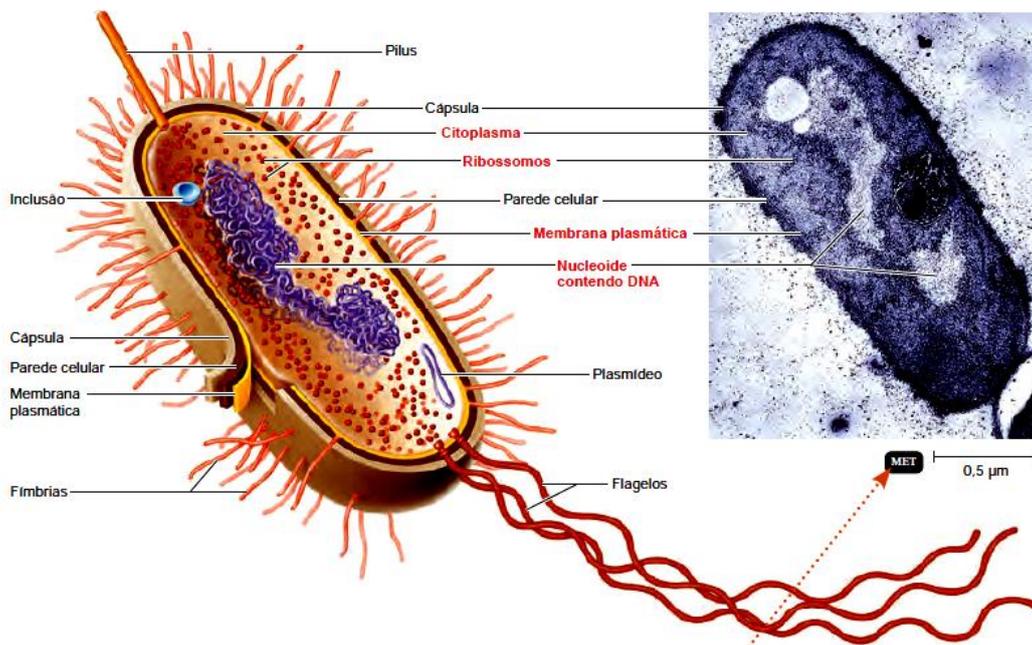
baumannii. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a ação da combinação de antimicrobianos e descrever quais alterações ultraestruturais causadas em isolados multidroga-resistentes de *A. baumannii*, provenientes de IRAS, quando submetidos à IGIV isoladamente e em combinação com colistina, meropenem e amicacina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA E ESTRUTURA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Bactérias (do latim, **bacteria**, singular: *bacterium*) são micro-organismos relativamente simples e de uma única célula (unicelulares). Como o material genético não é envolto por uma membrana nuclear, as células bacterianas são chamadas de procariotos, palavra grega significando pré-núcleo. O tamanho da maioria das bactérias podem variar de 0,2 a 2,0 μm de diâmetro e de 2 a 8 μm de comprimento (FIGURA 1). Elas possuem algumas formas básicas: cocos esféricos, bacilos em forma de bastão e espiral. Algumas espécies bacterianas, como *A. baumannii*, são ovais e tão parecidas com os cocos que são chamados de cocobacilos (TRABULSI; ALTERTHUM; 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

FIGURA 1- Estrutura celular de bactérias Gram-negativas



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012

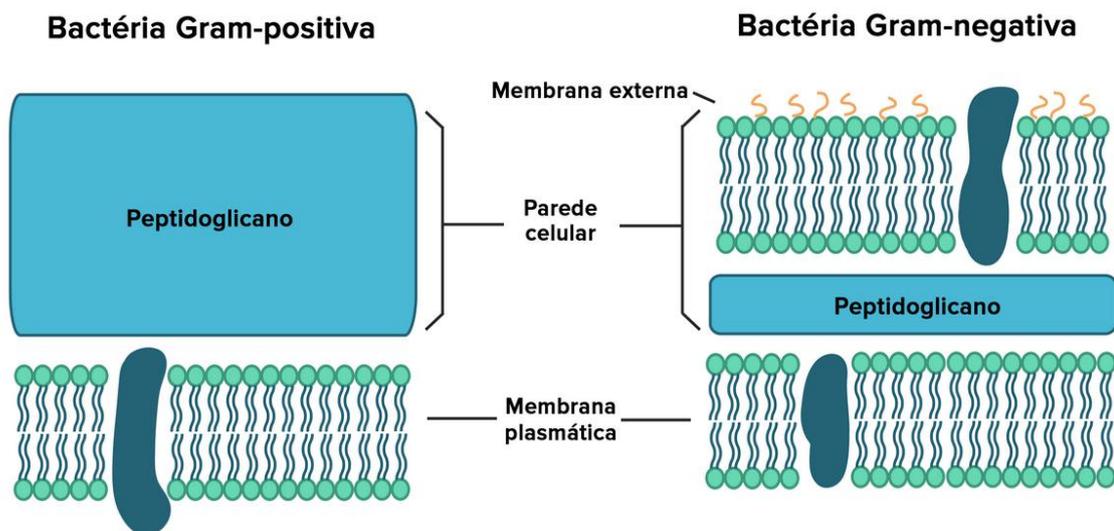
O citoplasma da célula bacteriana é uma solução aquosa limitada pela membrana plasmática. E nele estão imersas partículas insolúveis essenciais a célula bacteriana (ribossomos e nucleóide). O DNA bacteriano ou nucleóide, situado no citoplasma e não delimitado por membrana, é composto por fibrilas de DNA de dupla hélice na forma de uma única molécula de aproximadamente 1mm de comprimento (linearizada) e peso molecular de

2 a 3×10^9 d. Pode existir também DNA circulares, menores que os cromossomos que são capazes de conferir vantagens seletivas as bactérias que ao possuem, estas estruturas são denominadas de plasmídeos (KONEMAN, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM; 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O termo Gram origina-se do nome de Hans Christian Gram, que em 1984 desenvolveu o método de coloração que possibilitou dividir as células bacterianas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (KONEMAN, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM; 2008). Este método consiste em diferenciar estes dois grupos com base na suas características morfo tintoriais, observadas após tratamento com os reagentes: cristal violeta, lugol, álcool e fuccina (TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

A. baumannii pertence ao grupo das bactérias Gram-negativas. As bactérias que fazem parte deste grupo possuem menor espessura da parede celular, porém estruturalmente mais complexa que as Gram-positivas. A existência de uma membrana citoplasmática, membrana externa, um espaço periplasmático e uma menor camada de peptidoglicano na parede da célula as diferenciam das estruturas observadas nas bactérias Gram positivas (FIGURA 2), conferem a bactéria uma barreira hidrofóbica adicional dificultando a penetração do cristal violeta-lugol, facilitando a descoloração dos pelo álcool e permitindo a coloração pela fuccina (coloração avermelhada) (KONEMAN, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

FIGURA 2 - Parede celular bacteriana



A membrana externa da célula Gram-negativa consiste em lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolípídeos. E possui várias funções especializadas. Sua forte carga negativa é um fator importante na evasão da fagocitose e nas ações do complemento (causa lise de células e promove a fagocitose), dois componentes das defesas do hospedeiro. A membrana externa também fornece uma barreira para alguns antibióticos (p. ex., penicilina), enzimas digestivas como a lisozima, detergentes, metais pesados, sais biliares e certos corantes (MADIGAN, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Membrana plasmática (citoplasmática) (ou membrana interna) é uma estrutura fina situada no interior da parede celular, revestindo o citoplasma da célula. A membrana plasmática dos procariotos consiste principalmente de fosfolípídios, que são as substâncias químicas mais abundantes na membrana, e proteínas (MADIGAN, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O periplasma (espaço periplasmático) compreende o espaço entre as membranas externa e plasmática. Além do peptidoglicano, este local contém proteínas e enzimas degradativas, tais como: Enzimas hidrolíticas (proteases, nucleases e lípases) responsáveis pela quebra de macromoléculas, enzimas capazes de inativar drogas, tornando a células resistentes a elas e proteínas transportadoras de solutos que participam do transporte de substâncias para o interior da célula (KONEMAN, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

Vários procariotes sintetizam polímeros orgânicos que são depositados para fora da parede celular e são chamadas de substâncias poliméricas extracelulares, como a cápsula polissacarídica (camada que fica ligada a parede celular como um revestimento externo de extensão limitada e estrutura definida) (TRABULSI; ALTERTHUM; 2008). Existem ainda outras estruturas celulares que são geralmente encontradas bactérias Gram-negativas, como flagelos (estrutura responsável pelo movimento celular) e apêndices filamentosos protéicos que não são flagelos, estruturas conhecidas como fimbrias (ou pêlos) (KONEMAN; 2008, TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

2.2 *Acinetobacter baumannii*

Não se sabe o momento exato em que ocorreu o primeiro isolamento de um microrganismo do gênero *Acinetobacter*. Os cocobacilos Gram-negativos que provavelmente eram *Acinetobacter* foram isolados no ano de 1914 e, repetidamente, durante a década de 1940, mas foram anteriormente referidos como *Polimorfia mima* (agora *Acinetobacter lwoffii*), *Herellea vaginicola* (agora *Acinetobacter baumannii* ou *A. calcoaceticus*), *Bacterium anitratum*, *B5W* e *Moraxella lwoffii*. Como mostrado na literatura, até recentemente,

distinguir entre *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* era difícil, provavelmente refletindo a troca na identificação destas duas espécies (WONG et al., 2017).

Desde o ano de 1986, a taxonomia do gênero *Acinetobacter* foi modificada várias vezes. A classificação original de espécies únicas de *Acinetobacter calcoaceticus* foi abandonada (LIN; LAN, 2014). O gênero *Acinetobacter* contém 34 espécies formalmente nomeadas. Entre as espécies de importância clínica, inclui-se: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* em conjunto, formam o "complexo *A. baumannii*", sendo intimamente relacionados. São considerados importantes patógenos hospitalares e responsáveis pela maioria das infecções clinicamente significativas. Estas três espécies de importância clínica, em conjunto com outras espécies do gênero *Acinetobacter spp.*, estão intimamente relacionadas, e também são comumente encontradas no ambiente natural. Estas espécies juntamente com a *Acinetobacter calcoaceticus*, são agrupados sob o termo "complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*" ou complexo ACB (KONEMAN et al., 2008; KIM et al., 2014, FUJIKURA et al., 2016).

A identificação de espécies de *Acinetobacter spp.* é um desafio para taxonomia, devido às espécies intimamente relacionadas e a difícil distinção com traços fenotípicos e métodos quimiotaxonômicos. Sendo necessário para a identificação e confirmação das espécies deste gênero, o uso de sistemas automatizados ou sistemas comerciais, como o VITEK ou sistema API, respectivamente (KIM et al., 2014, LIN; LAN, 2014).

Com os avanços na taxonomia molecular bacteriana, tem sido proposto um número de métodos genômicos *fingerprinting*, incluindo electroforese em gel de campo pulsado (PFGE), ribotipagem e técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como: análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso, PCR baseada em sequência palindrômica extragenética repetitiva (rep-PCR), análise da restrição do DNA ribossômico amplificado, impressão digital de espaçador de RNA e análise do polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado. Além disso, novos métodos, como o espaçador intergênico ribossômico 16S-23S, o gene 16S rRNA, o gene *rpoB* e a análise da sequência do gene *gyrB*, foram desenvolvidos para identificar e distinguir com mais precisão e confiabilidade as espécies de *Acinetobacter* (KIM et al., 2014; LIN; LAN, 2014).

O gênero *Acinetobacter* é formado por coco-bacilos pertencentes à subclasse γ -Proteobacteria, família Moraxellaceae, compreendendo um grupo heterogêneo de microrganismos aeróbios Gram-negativos, não hemolíticos, e que são normalmente encontrados em formações diplóides ou cadeias de comprimento variável. *Acinetobacter spp.* apresentam-se como não fermentadores de glicose, lactose, oxidase negativa, catalase

positiva, indol negativa e nitrato negativo. Após 24 horas de incubação em ágar sangue, as colônias apresentam entre 0,5 a 2µm de diâmetro, são translúcidas a opacas (nunca pigmentadas), convexas e inteiras. A maioria cresce bem em ágar MacConkey e produz uma leve cor rosada (FIGURA 3) (KONEMAN et al., 2008; AL-AGAMY et al., 2014; KIM et al., 2014; LIN; LAN, 2014).

FIGURA 3 - *Acinetobacter baumannii* cultivado em ágar MacConkey.



Fonte: American Society for Microbiology (2005).

Acinetobacter spp. são onipresentes em ambientes naturais, como solo e água, podendo ser encontrados, ocasionalmente, como comensais na pele, na garganta e nas secreções de indivíduos saudáveis (KONEMAN, 2008, KIM et al., 2014). Anteriormente acreditava-se que as espécies de *Acinetobacter* não eram um patógeno comum humano, e que fossem uma causa incomum de infecção (KIM et al., 2014). Contudo, sabe-se que espécies deste gênero são comumente encontradas, sendo *A. baumannii*, a espécie mais isolada do gênero no ambiente hospitalar e em pacientes hospitalizados (KIM et al., 2014; LIN; LAN 2014).

Acinetobacter baumannii é a principal espécie causadora de infecção do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, sendo considerado um grave patógeno hospitalar, tornando-se

cada vez mais comuns infecções causadas por esta espécie bacteriana nas últimas décadas e levando ao aumento da morbidade e mortalidade por IRAS. Este microrganismo faz parte do grupo ESKAPE, composto por bactérias patogênicas que emergiram por sua capacidade de causar graves infecções em pacientes hospitalizados e escaparem da ação dos antimicrobianos, além de demonstrarem novas formas de transmissão e patogênese (TIWARI, 2018). Este grupo foi denominado coletivamente de ESKAPE, que são as letras iniciais das espécies bacterianas que compõem o grupo, pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA). As espécies bacterianas que formam o grupo ESKAPE inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter spp.* (BOUCHER et al., 2009, TIWARI, 2018).

As infecções produzidas por *Acinetobacter baumannii* incluem: pneumonia (hospitalares e adquiridas na comunidade), bacteremia, endocardite, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário e meningite (PASANEN et al., 2014, ELHOSSEINYA; ELHEZAWYB; ATTIAA, 2019). Em maior parte dos casos, acredita-se que as infecções são adquiridas após a exposição ao *A. baumannii*, que persiste em contaminar equipamentos hospitalares ou por contato com o pessoal de saúde, que tenham sido expostos ao microrganismo através do contato com um paciente colonizado. No entanto, apesar da crescente importância clínica de infecções por *A. baumannii*, relativamente pouco se sabe sobre os fatores que contribuem a sua patogênese (MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; AL-AGAMY et al., 2014).

Dados mostram que a taxa de mortalidade por infecções de corrente sanguínea associado ao patógeno *A. baumannii* é de aproximadamente 25%, dependendo do estado imunológico do paciente e local de atendimento. Apresentando taxas de mortalidade que variam de 5% em pacientes em enfermarias gerais a 52% em pacientes sob cuidados intensivos (FUJIKURA et al., 2016). Já em pacientes com infecções crônicas do trato urinário, bacteremia, pneumonia e paciente graves em UTI, a taxa de mortalidade registrada varia entre 2 e 10% (PRIYADHARSINI; GIRIJA; PARAMASIVAM; 2018).

Algumas características são determinantes na patogênese envolvendo isolados de *A. baumannii* são a formação de biofilme, que considerado o principal fator de virulência, a ativação da proteína A da membrana externa associada à apoptose em células humanas, sistema de captura de ferro, fosfolipases, lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, sistemas de secreção de proteínas e um sistema de detecção de quórum (KIM et al, 2014, LEE et al. 2017).

2.3 TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Acinetobacter baumannii*

Visto sua propensão para desenvolver resistência aos antimicrobianos, as estratégias de tratamento atuais para infecções por *A. baumannii* são muito limitadas, não existindo um comportamento clínico definido para comparar os regimes de tratamentos dos pacientes, aliada ao não desenvolvimento de novos fármacos para tratar estas infecções. Para infecções por *A. baumannii* suscetível, geralmente permanece um número suficiente de agentes antimicrobianos seguros e eficazes que podem ser usados para tratamento, tendo os beta-lactâmicos como as principais escolhas antibacterianas por responderem com eficácia à terapia (MARAGAKIS; PERL, 2008; VIEHMAN; NGUYEN; DOI, 2014, WONG et al., 2017).

Porém, devido à crescente resistência aos antimicrobianos, os carbapenêmicos se tornaram uma opção terapêutica crítica para tais infecções. Para os carbapenêmicos (como todos beta-lactâmicos), o melhor preditor de eficácia é o tempo em que as concentrações séricas de carbapenêmicos permanecem acima da concentração inibitória para o isolado bacteriano. A infusão prolongada de carbapenêmicos pode maximizar o tempo acima da CIM, otimizando assim os resultados, particularmente para patógenos resistentes. (MARAGAKIS; PERL, 2008, WONG et al., 2017).

Infelizmente, as taxas de resistência a carbapenêmicos em infecções por *A. baumannii* vêm crescendo drasticamente em todo mundo. Para cepas resistentes a carbapenêmicos, o arsenal de antimicrobianos é bastante limitado (WONG et al., 2017). Esta diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos impulsionou a busca de novas abordagens terapêuticas alternativas. Além deste desafio, quando *A. baumannii* adquire resistência aos carbapenêmicos, muitas vezes há resistência a todos os outros agentes comumente usados na clínica de infecções, como cefalosporinas, penicilinas e quinolonas (DOI; MURRAY; PELEG, 2015). As cepas que são extensivamente resistentes a fármacos podem permanecer susceptíveis a alguns antimicrobianos como polimixinas (colistina ou polimixina B), aminoglicosídeos e tigeciclina. Portanto, os regimes de tratamento poderão incluir pelo menos uma dessas duas classes de agentes com ou sem um segundo agente, a depender de cada caso (DOI; MURRAY; PELEG, 2015, ANVISA, 2019).

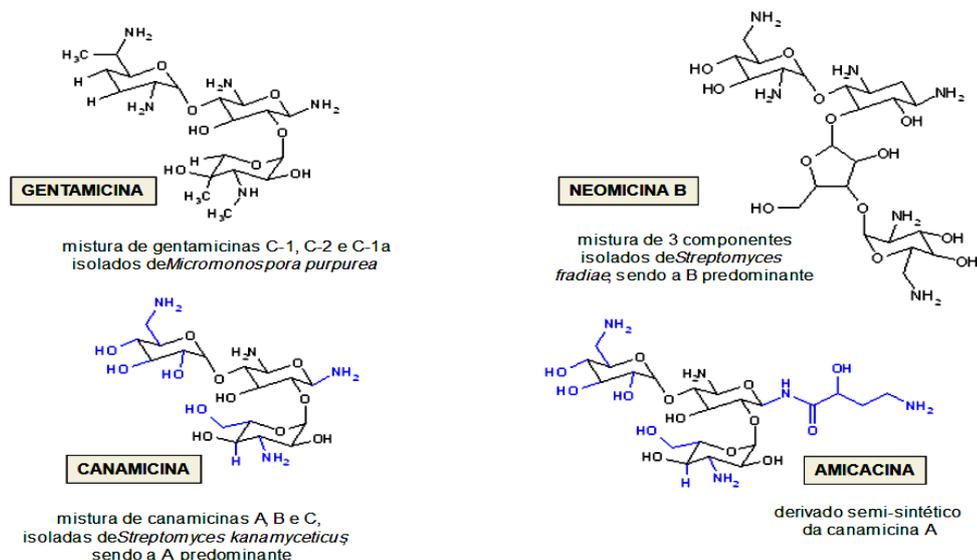
A combinação de dois fármacos com atividade individual contra determinado microrganismo tem como objetivo resultar em uma combinação farmacológica mais potente. Porém, para muitas combinações, verifica-se que isso pode não acontecer. Quando dois

fármacos com atividades diferentes são combinados contra o mesmo patógeno, eles podem interagir para aumentar a eficácia da combinação (sinergismo) ou diminuí-la (antagonismo). Alternativamente, os fármacos podem não interagir (indiferente), ou também o efeito da combinação consistir simplesmente na soma dos efeitos de cada fármaco utilizado individualmente (aditividade) (GOLAN et al., 2009).

2.3.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são parte importante do arsenal terapêutico desde seu descobrimento na década de 1940. Os estudos que culminaram com o descobrimento desta classe de antimicrobianos iniciaram-se no ano de 1939 no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers de New Jersey nos Estados Unidos. Em 1943, após examinar vários actinobactérias de solo, isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A partir de então, no ano de 1944, a estreptomomicina foi isolada, seguida pela descoberta de uma série de novas substâncias com potencial antibacteriano, produzida por actinomicetos, assim como os aminoglicosídeos semissintéticos, amicacina e netilmicina derivados da canamicina e sisomicina, respectivamente (FIGURA 4) (OLIVEIRA et al., 2006, GOLAN et al., 2009, KRAUSE et al., 2016).

FIGURA 4 - Estrutura química dos aminoglicosídeos



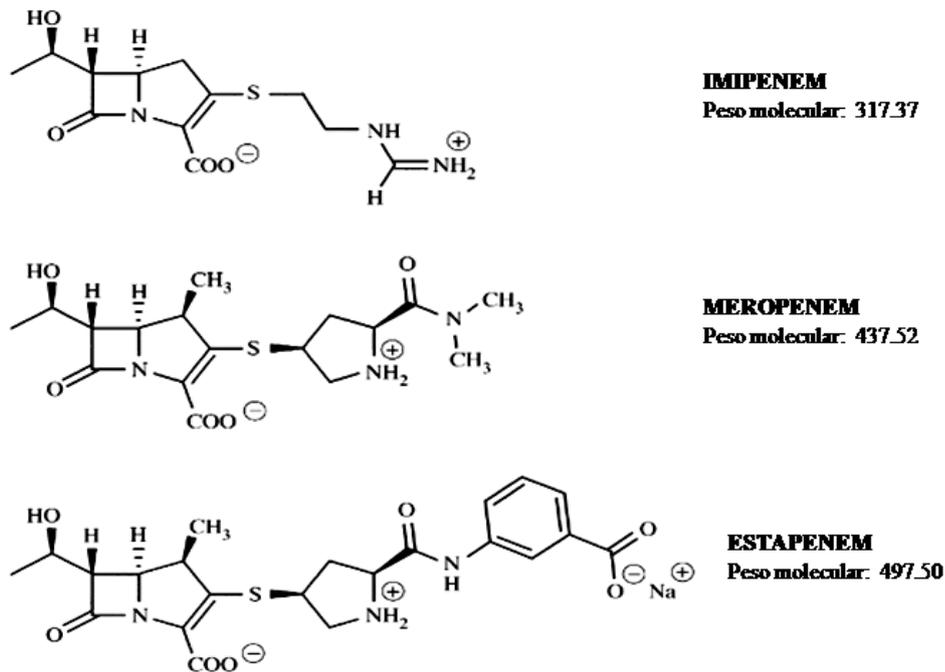
Os aminoglicosídeos ligam-se à fração 30S alterando a forma dos ribossomos, inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas defeituosas. Para atuar, este antimicrobiano deve primeiramente ligar-se à superfície da célula bacteriana e posteriormente, deve ser transportado através da parede por um processo dependente de energia oxidativa (ANVISA, 2015).

Os principais usos dos aminoglicosídeos são para diversas infecções, entre elas: septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias e intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares e de articulações, osteomielites, dentre outras. Esta classe de antimicrobianos apresenta grande atividade contra bacilos e cocos Gram-negativos aeróbios, além de bactérias Gram-positivas e micobactérias. A amicacina possui o maior espectro de ação do grupo, sendo utilizada em infecções por bacilos Gram-negativos resistentes a gentamicina e na terapia empírica de IRAS, além de ser útil na terapia das micobacterioses, em casos específicos de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium avium* (ANVISA, 2015).

2.3.2 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são uma classe de antimicrobianos beta-lactâmicos que substituem um átomo de carbono por um de enxofre e acrescentam uma ligação dupla ao núcleo de penicilina (FIGURA 5). Atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana e possuem um espectro de atividade mais amplo (TORTORA, 2005). Dentre os beta-lactâmicos de amplo espectro, os carbapenêmicos foram introduzidos no ano de 1985 e continuam sendo o agente mais importante para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR (ZARRILLI et al., 2009). Os carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem são os antimicrobianos disponíveis atualmente na prática clínica nos EUA, Europa e Brasil, apresentando amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas e são estáveis à maioria das β -lactamases (ANVISA, 2019).

FIGURA 5 - Estrutura química dos carbapenêmicos.



Fonte: SHAH; ISAACS, 2003

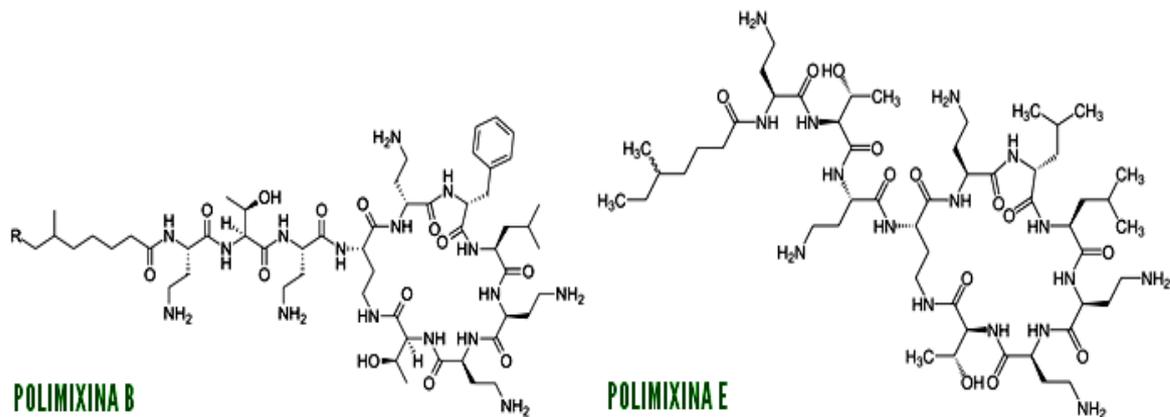
Os carbapenêmicos eram comumente considerados como antimicrobianos de último recurso e assumem um grande papel no tratamento de graves infecções causadas por bactérias MDRs (BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013). Ao longo da última década, o aparecimento de isolados resistentes aos carbapenêmicos tem sido de grande relevância por reduzir as opções terapêuticas atuais, portanto, deixando poucos ou, em alguns casos, nenhuma opção terapêutica ideal (VOULGARI et al., 2013; LEE et al., 2017).

Atualmente, existe grande interesse em duas moléculas para tratamento de infecções causadas pelo *A. baumannii* MDR (FAM et al., 2017). Os beta-lactâmicos, em combinação com outra classe de antimicrobiano, têm demonstrado eficiente tratamento na infecção causada por *A. baumannii* com moderada resistência ao imipenem. Porém, para cepas pan-resistentes, a colistina permanece como fármaco de escolha. Este antimicrobiano tem sido usado com sucesso no tratamento de infecções severas, tais como meningites, bacteremia ou pneumonia. No entanto, a deterioração da função renal é o principal efeito colateral, com a prevalência variando de 19 a 27% (FOURNIER; RICHET, 2006; FAM et al., 2017, DAFOPOULOU et al., 2019, RODRIGUEZ et al., 2019).

2.3.3 Polimixinas

As polimixinas são decapeptídeos policatiônicos cíclicos, produzidos pela bactéria *Bacillus polymyxa*, caracterizados por um anel heptapeptídeo, alta porcentagem de ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) e um ácido graxo ligado ao peptídeo através de uma ligação amida. O anel se completa através dos grupos α -amino e carboxil do resíduo do Dab na posição 4. A colistina (polimixina E) diferencia-se da polimixina B pela presença do aminoácido D-leucina no lugar de D-fenilalanina na posição 6 (FIGURA 6) (ADAMS et al., 2009, KIM et al., 2014).

FIGURA 6 - Estrutura química das polimixinas.



Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br>

O colestimetato de sódio (CMS) é um derivado da colistina obtido através da reação com formaldeído e bissulfito de sódio. Este derivado é menos potente em comparação com o composto original e parece causar menos efeitos colaterais. Após a administração, o CMS é convertido em colistina *in vivo* e ambas as formas circulam pelo organismo. Um estudo prévio sugeriu que o CMS fica inativa e seu efeito bactericida depende da metabolização *in vivo* para formar colistina, que seria o único composto ativo (MENDES; BURDMANN, 2009).

Dada a mudança no perfil de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas MDR, especialmente *A. baumannii*, levando a limitações das opções terapêuticas, o uso de polimixinas B ou polimixinas E (colistina) retornou para a maioria das infecções por *Acinetobacter* spp. Colistina age destruindo a membrana celular bacteriana, aumentando sua permeabilidade e levando a morte celular. É um antimicrobiano eficaz contra espécies de *Acinetobacter* e seu efeito depende da concentração de uso. Existem relatos sobre resistência às polimixinas, possivelmente como um resultado das alterações da membrana externa ou um

mecanismo da bomba de efluxo. Estudos relatam a cura ou melhora pela colistina numa taxa de 57 a 77% de pacientes em estado grave com infecções de *Acinetobacter* MDR, incluindo pneumonia, bacteremia, septicemia, infecção intra-abdominal, e infecção do sistema nervoso central (MARAGAKIS; PERL, 2008; LEITE et al., 2015; VAARA, 2019).

2.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Acinetobacter baumannii*

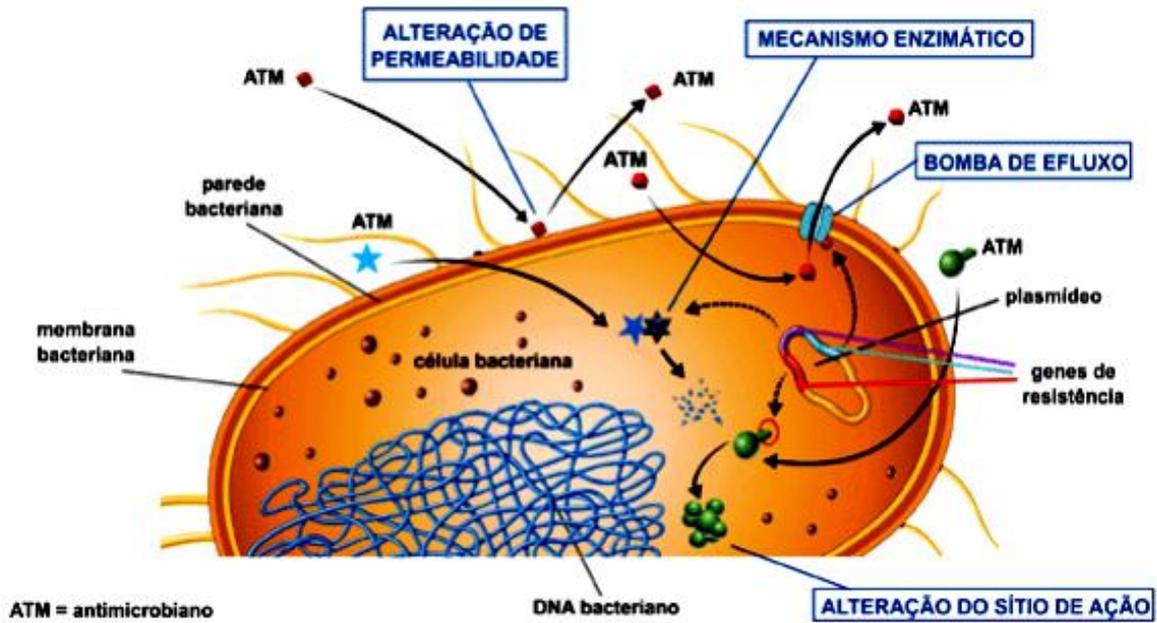
A. baumannii tem emergido globalmente como um patógeno nosocomial de grande importância clínica, devido ao aumento do número de infecções em humanos acometidos por isolados desta espécie (TURTON et al, 2006; 2007; SKIEBE et al., 2012; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; KIM et al., 2014; LEITE et al., 2015).

Infecções por *A. baumannii* afetam particularmente pacientes que se encontram em unidades de queimados e nas unidades de terapia intensiva, muitas vezes causando surtos e geralmente apresentando resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis. Há relatos de aumento da prevalência deste microrganismo MDR em hospitais de muitos países, incluindo o Brasil, Reino Unido, França, Espanha, Portugal, Itália, Grécia, Israel, Bulgária, EUA e Rússia, com surtos ocorrendo em vários hospitais (TURTON et al., 2006; 2007; SKIEBE et al., 2012; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013, VIEIRA; PICOLI, 2015).

Acredita-se que a sua competência em resistir em ambientes hospitalares esteja ligada à sua capacidade de formar biofilmes e adquirir resistência aos antimicrobianos, assim contribuindo para a sua sobrevivência nesse ambiente (MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013; KIM et al., 2014). Por estas razões, espécies do gênero *Acinetobacter* são frequentemente encontradas na pele e no trato respiratório e urinário de pacientes hospitalizados (MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013, WONG et al., 2017).

Os mecanismos de resistência mais encontrados em isolados do gênero *Acinetobacter* para escapar e sobreviver à ação dos antimicrobianos inclui a resistência antimicrobiana intrínseca, enzimas de degradação antimicrobiana, bombas de efluxo, modificação alvo e perda de porina (FIGURA 7). O mais importante mecanismo, no entanto, é a grande capacidade para adquirir resistência a antimicrobianos, levando para MDR e até mesmo *Pandrug resistance* (PDR) (KIM et al., 2014).

FIGURA 7 - Mecanismos de resistência aos antimicrobianos por *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: ANVISA, 2007

A rápida capacidade de aquisição de genes de resistência codificados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, constituem grande problemática envolvendo infecções por isolados de *A. baumannii*, devido ao aumento da resistência fenotípica e MDR destes isolados que, em alguns casos, são resistentes a todos ou quase todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (FOURNIER; RICHET, 2006; KIM et al., 2014). A grande incidência de MDR em isolados de *A. baumannii* torna desafiador o tratamento de infecções causadas por esses isolados bacterianos, devido à diminuição crescente de opções terapêuticas disponíveis, levando ao risco de entrada em uma era pós-antibiótico iminente (RUSSO et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) forneceu um alerta sobre *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos, que assegura o seu lugar na categoria “crítica” de infecções. Um fato pouco conhecido sobre o *A. baumannii* é sua rápida evolução da forma MDR à forma extensivamente resistente (XDR) a antimicrobianos, e que recentemente foi elevado ao *status* de Pandroga resistência (PDR). A resistência inata, juntamente com a capacidade de acomodar fatores de resistência extrínseca, contribuiu para o ressurgimento desse patógeno com o máximo potencial (PRIYADHARSINI; GIRIJA; PARAMASIVAM; 2018).

2.4.1 Resistência a carbapenêmicos

Mecanismos que conferem resistência aos beta-lactâmicos já foram relatados em *A. baumannii*. Os principais mecanismos encontrados são a produção de enzimas beta-lactamases, alterações na proteína da membrana externa, a produção de proteínas de ligação à penicilina e aumento da atividade das bombas de efluxo. No entanto, o mecanismo mais prevalente de espectro estendido de resistência à cefalosporina e carbapenêmicos em *A. baumannii* é a degradação enzimática por β -lactamases. A classe Ambler A, B, C e D β -lactamases conferem vários fenótipos de resistência, tais como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), metalo- β -lactamases (AL-AGAMY et al., 2014, KIM; 2014).

A maioria dos isolados de *A. baumannii* envolvidos em surtos infecciosos são altamente resistentes aos diferentes antimicrobianos disponíveis, incluindo, cada vez mais, a resistência aos carbapenêmicos, como o meropenem e imipenem, que são fármacos de escolha em infecções graves causadas por este microrganismo (TURTON et al., 2006; 2007).

Carbapenemases têm sido cada vez mais relatadas em espécies de enterobactérias e também em *Acinetobacter* spp. ao longo dos últimos 10 anos em todo o mundo. A incidência de infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenêmicos isolados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) também aumentou, representando um problema global. Surtos nosocomiais e infecções endêmicas em UTIs são comuns, devido uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro e dispositivos médicos colonizados por estas espécies, bem como um aumento no número de pacientes imunocomprometidos (KIM et al., 2014).

A resistência em *A. baumannii* a carbapenêmicos são, geralmente, codificadas por serina oxacilinases (OXAs; classe D de Amber) bla_{OXA-23} , bla_{OXA-40} , bla_{OXA-58} e pelas metalo- β -lactamases e (MBLs; classe B de Amber) genes bla_{VIM} , bla_{IMP} , e bla_{SIM} (KIM et al., 2014).

As enzimas do tipo OXAs não são inibidas pelo ácido clavulânico e têm sido encontradas na maioria das regiões do mundo, ao passo que as MBLs conferem resistência aos carbapenêmicos e os demais beta-lactâmicos, com a exceção de aztreonam. Resistência a carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* é mais frequente, devido à produção de OXA, enquanto a produção de MBL é mais prevalente em isolados de outras espécies do gênero *Acinetobacter*. Em *A. baumannii*, o nível de resistência aos carbapenêmicos fornecida por OXAs é consideravelmente menor do que a mediada por MBLs. Em particular, algumas destas enzimas não hidrolisam meropenem (KIM et al., 2014).

Os genes de resistência intrínsecos para produção de β -lactamases são encontradas na maioria dos isolados de *A. baumannii*, como as cefalosporinas tipo *AmpC*, expressas em

nível basal sem reduzir a eficácia de cefalosporinas de terceira geração e as oxacilinas, representadas pelos subtipos OXA-51 com localização cromossômica e a OXA-69 com diversas variantes, as quais são amplamente estudadas para elucidação de sua atividade carbapenemase (POIREL; NORDMAN, 2006).

Além das OXAs e da AmpC, que conferem resistência aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, também já foi detectado em isolados de *A. baumannii*, o gene *bla_{KPC}*. A KPC é uma carbapenemase potente identificada inicialmente em isolado de *Klebsiella pneumoniae* nos Estados Unidos e depois em outros membros da família *Enterobacteriaceae* e em outras regiões geográficas do mundo, devido à sua localização em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e/ou integrons (ROBLEDO et al., 2010; VOULGARI et al., 2013). Enzimas KPC estão entre os β -lactamases mais comuns, mediando resistência aos carbapenêmicos. Estas são β -lactamases de classe A que além de carbapenêmicos, também conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, como as cefalosporinas de espectro estendido (TENOVER et al., 2006). O gene *bla_{KPC}* em *A. baumannii* já foi encontrado em países, como Brasil, Porto Rico e também na Ásia (ROBLEDO et al., 2010; AZIMI et al., 2015, RIBEIRO et al., 2016).

2.4.2 Resistência a colistina

Três mecanismos que conferem resistência à colistina são conhecidos: (1) perda ou modificação de lipopolissacarídeos, especificamente do lipídeo A, um componente da membrana externa, resultando na redução da carga negativa da membrana externa; (2) clivagem proteolítica dos antimicrobianos e (3) ativação de uma bomba de efluxo de amplo espectro. A via mais comumente relatada em *A. baumannii* é a adição de uma fração fosfoetanolamina ao lipídeo hepta-acilado A, que reduz a carga negativa do lipídeo A e diminui a afinidade da colistina (ADAMS et al., 2009, VIEHMAN; NGUYEN; DOI, 2014).

Outra hipótese para o mecanismo de resistência a colistina seria devido a uma mutação nos genes que codificam as proteínas Pmr A e B, que são relacionados com a expressão aumentada do sistema e PmrAB e alterações da sequência de aminoácido. Apesar da resistência adquirida a colistina continuar a ser rara entre isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., algumas espécies parecem possuir resistência intrínseca a colistina, sem resistência a múltiplos fármacos (KIM et al., 2014), tendo como uma possível explicação para esse fato, a perda de lipopolissacarídeo da sua membrana externa (TSENG et al., 2016).

Apesar de raro, já foram encontrados relatos de isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, que são frequentemente agentes terapêuticos de última linha usados para tratar infecções causadas por bactérias MDR desta espécie (CHEAH et al., 2016; TSENG et al., 2016). Resistência a colistina já foi vista em alguns países, como Irã, Estados Unidos, Catar e no Brasil (ADAMS et al., 2009; ALAEI; AZIEMZADEH; BAHADOR, 2016; LEITE et al., 2016; SAMAWI et al., 2016).

2.4.3 Resistência a aminoglicosídeos

Existem três mecanismos reconhecidos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, incluindo: ocorrência de alterações dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade bacteriana e modificação enzimática do fármaco. Os genes que conferem resistência podem estar associados à plasmídeos conjugativos e não conjugativos, e em transposons, e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano. O desenvolvimento da resistência ao antimicrobiano durante o tratamento com aminoglicosídeos para isolados sensíveis é raro (ANVISA, 2015; KRAUSE et al., 2016, SERIO et al., 2018).

Os aminoglicosídeos se ligam ao RNA ribossômico 16S da subunidade ribossômica 30S e inibem a síntese proteica. *A. baumannii* produz várias enzimas modificadoras de aminoglicosídeos para adquirir resistência a esta classe de antimicrobianos. Existem três grupos funcionais de enzimas modificadoras, que incluem acetiltransferases de aminoglicosídeos (por exemplo, AAC (6') - Ib), aminoglicosídeos fosfotransferases (por exemplo, APH (3') - Ia) e aminoglicosídeos adeniltransferases (por exemplo, ANT (2'') - Ia). Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos comumente encontradas em *A. baumannii* são AAC (6') - Ib, AAC (6') - Ih (conferindo resistência a tobramicina e amicacina), AAC (3) - Ia, ANT (2'') - Ia e APH (3') - Ia (conferindo resistência à gentamicina). Outro mecanismo de resistência aminoglicosídeos que está emergindo é a produção de 16S ribossomal RNA metiltransferase, especialmente ArmA. ArmA metila um resíduo de guanina no sítio de ligação de aminoglicosídeo (site A) de 16S rRNA e protege-lo da ligação ao aminoglicosídeos. *A. baumannii* produtor de ArmA são altamente resistentes a gentamicina, tobramicina e amicacina, e são comumente visto entre isolados clones (VIEHMAN, NGUYEN; DOI, 2014; DOI; MURRAU; PELEG, 2015).

2.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS BACTERIANAS

O conhecimento sobre a morfologia das células bacterianas é necessário para a compreensão dos prováveis mecanismos de ação de diferentes agentes antimicrobianos sobre a célula bacteriana, podendo estes agir em diferentes estruturas celulares, como em componentes da parede celular, no citoplasma, vias metabólicas, enzimas, no material genético bacteriano, genes que sofreram mutação e em produtos gênicos que estão presentes no patógeno (DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010; GOLAN et al., 2014).

As bactérias são organismos que freqüentemente contêm alvos exclusivos para intervenção farmacológica. Dependendo do papel do alvo do fármaco na fisiologia bacteriana podem produzir efeitos bacteriostáticos ou bactericidas. Os fármacos que inibem o crescimento do patógeno sem causar a sua morte são denominados bacteriostáticos. Esses fármacos são dirigidos contra alvos de vias metabólicas necessárias para o crescimento das bactérias, mas não para a sua sobrevivência. Os inibidores da síntese protéica (os aminoglicosídeos constituem uma exceção) exercem, em sua maioria, um efeito bacteriostático. A eficiência clínica desses fármacos baseia-se na integridade do sistema imune do hospedeiro para eliminar as bactérias que não crescem (mas que permanecem viáveis). Em contrapartida, os fármacos bactericidas matam as bactérias (GOLAN et al., 2014).

Diferentes substâncias químicas podem danificar a parede celular bacteriana ou interferir na sua síntese, e ainda assim não prejudicar as células de um hospedeiro animal, pois a parede celular bacteriana é composta de substâncias diferentes daquelas presentes nas células eucarióticas. Portanto, a síntese da parede celular é o alvo de algumas drogas antimicrobianas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Como exemplo dessas substâncias, temos os antibióticos β -lactâmicos são os agentes antibacterianos comumente prescritos e atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, pela inativação de várias enzimas, como as PBPs (Proteínas Fixadoras de Penicilina), responsável pela síntese final do peptidoglicano e que são essenciais para o crescimento e divisão das células bacterianas (LEGAREE; CALVIN; ANTHONY, 2007).

Ao submeter diferentes espécies a antimicrobianos, que tem como alvo a parede celular, as células bacterianas podem sofrer diversas alterações na sua morfologia. A alteração na forma da célula, com a formação de esferoplastos ou células ovóides, a desorganização da membrana citoplasmática, a presença de bolhas ou enrugamento na superfície da célula e aumento no espaço periplasmático, sugerindo retração do citoplasma (CUSHNIE;

O'DRISCOLL; LAMB, 2016, SCAVUZZI et al., 2016; FAM et al. 2017). Podendo ocorrer também alongamento da célula, devido a sucessivas divisões celulares em que o septo não foi formado corretamente. Quando os danos a estrutura da parede celular bacteriana são severos demais, pode acarretar a ocorrência de ruptura da célula com posterior perda de material citoplasmático (DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010; TANAKA et al., 2010, VERAS et al., 2015; CUSHNIE; O'DRISCOLL; LAMB, 2016; SCAVUZZI et al., 2016; FAM et al. 2017).

Outros antimicrobianos agem no citoplasma da célula bacteriana causando desorganização do citoplasma. Como também interferindo na replicação do DNA bacteriano, inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas defeituosas (ANVISA, 2007; VERAS et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016), possibilitando evidenciar a diminuição do volume e compartimentalização do citoplasma, como também condensação de ribossomos, a coagulação ou destruição do DNA (VERAS et al., 2015, SCAVUZZI et al., 2016).

2.6 IMUNIDADE HUMANA A INFECÇÕES BACTERIANAS

A resposta imunológica tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade. A defesa contra invasão de microrganismos é mediada pelos mecanismos efetores da imunidade inata (natural) e adaptativa (adquirida) (FIGURA 8). O sistema imunológico inato proporciona a defesa inicial, e o sistema imunológico adaptativo proporciona uma resposta mais sustentada e mais forte, isto ocorre principalmente devido ao grande número de linfócitos antígeno-específico e sua diferenciação. Muitos microrganismos patogênicos já resistem aos mecanismos de defesa do sistema imunológico inato, fazendo com que a proteção fique a cargo das respostas imunológicas adaptativas. As respostas imunológicas adquiridas induzem as células efetoras que eliminam os microrganismos e as células de memória que protegem o indivíduo de infecções subsequentes (MACHADO et al., 2004, ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

FIGURA 8 - Imunidade humana a infecções bacterianas

I. Barreiras naturais contra as infecções / <i>Natural barriers against infection</i>
II. Imunidade inata / <i>Innate immunity</i>
1. Moléculas extracelulares (proteína C reativa, complemento) / <i>Extracellular molecules (C reactive protein, complement)</i>
2. Células NK, neutrófilos, macrófagos / <i>NK cells, neutrophils, macrophages</i>
3. Quimiocinas, citocinas / <i>Chemokines, cytokines</i>
III. Imunidade adquirida / <i>Acquired immunity</i>
1. Anticorpos / <i>Antibodies</i>
2. Citocinas produzidas por células T / <i>Cytokines produced by T cells</i>

Fonte: MACHADO et al., 2004.

Como as bactérias extracelulares são capazes de se replicarem no exterior das células do hospedeiro, algumas barreiras iniciais são importantes para limitar a infecção bacteriana, contribuindo na expulsão dos patógenos. Dentre essas barreiras destacam-se os movimentos peristálticos, a secreção de muco do trato gastrointestinal, os movimentos ciliares das vias aéreas, além de um epitélio íntegro que atua como uma barreira física entre o patógeno e o tecido do hospedeiro. No caso de bactérias que colonizam o sistema circulatório, essas são removidas pelo baço e fígado, uma vez que estes locais são ricos em células fagocíticas (células de Kupffer) e a circulação sanguínea é lenta, favorecendo assim a eliminação das bactérias extracelulares (COELHO-CASTELO et al., 2009).

Dentre os mecanismos da imunidade inata envolvida na eliminação das bactérias extracelulares destacam-se a ação das defensinas, citocinas e do sistema complemento (via alternativa ou das lectinas). Quanto à resposta adaptativa, a imunidade humoral é o principal mecanismo envolvido na eliminação das bactérias extracelulares. Os anticorpos, produzidos contra esses patógenos, desempenham mecanismos efetores importantes como: 1) Neutralização; 2) Oponização favorecendo a fagocitose e 3) a ativação do complemento pela via clássica. Na neutralização contra a bactéria ou contra suas toxinas, os anticorpos (IgG, IgA) impedirão a ligação dos mesmos a receptores presentes na superfície das células alvos, neutralizando, assim, a ação desses microorganismos (MACHADO et al., 2004; COELHO-CASTELO et al., 2009).

A ação dos anticorpos pode ser do tipo opsonina, onde as bactérias são revestidas por anticorpos do tipo IgG e fagocitadas por macrófagos e neutrófilos, através de receptores para a porção Fc presente nessas células. Após a fagocitose, as bactérias são destruídas no fagolisossomo. A via clássica do sistema complemento também atua. Nesse aspecto a geração e deposição de C3b levará a opsonização do patógeno, seguido pela fagocitose via receptor presente em macrófagos e neutrófilos; a indução de uma resposta inflamatória, e a formação

do complexo de ataque à membrana que resultará na lise direta do patógeno. Adicionalmente, células apresentadoras de antígenos, após a fagocitose e degradação antigênica nos lisossomos, estimulam células TCD⁴ que reconhecem peptídeos antigênicos no contexto de moléculas de MHC de classe II, levando essas células a produzirem IFN- γ (potente ativador de macrófagos), TNF (citocina inflamatória), que podem favorecer a destruição das bactérias e colaborar com células B para a produção de outros isotipos de anticorpos (CARVALHO et al., 1998, COELHO-CASTELO et al., 2009).

2.7 IMUNOGLOBULINA G INTRAVENOSA HUMANA

Os anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas circulantes produzidas pelos vertebrados em resposta à exposição a estruturas não próprias conhecidas como antígenos. São incrivelmente diversos e específicos em sua capacidade de reconhecimento de estruturas moleculares não próprias, sendo mediadores primários da imunidade humoral contra todas as classes de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A Imunoglobulina G (IgG), um isotipo de imunoglobulina, apresenta as seguintes funções: opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo, imunidade neonatal e auto-inibição do linfócito B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Tradicionalmente, a Imunoglobulina G Intravenosa Humana (IVIG) tem sido utilizada como terapia de reposição para pacientes com deficiências de imunoglobulinas primárias ou secundárias. Cada vez mais, a IVIG vem sendo utilizada (em doses mais elevadas do que para a terapia de reposição) em certas doenças infecciosas bacterianas ou virais (FERRARA; ZUMLA; MAEURER, 2012; MILLER; SCHAUF; SALO, 2016, SALLAM; ABOU-AISHA; EL-AZIZI, 2016). Uma variedade de modos de ação tem sido atribuída aos efeitos benéficos da IVIG, incluindo sua interação com a função das células T, células apresentadoras de antígenos, além de maturação das células de apresentação com efeito geral sobre as reações inflamatórias, sendo seu uso avaliado em ensaios clínicos para o tratamento de infecções crônicas refratárias, difíceis de tratar (FERRARA; ZUMLA; MAEURER, 2012).

No Japão e em outros países, o tratamento com IgG do soro humano e antibióticos para graves infecções por diferentes espécies bacterianas tem revelado resultados bem sucedidos, o que motivou a realização de estudos quanto a atividade *in vitro* da IgG humana frente a isolados de diferentes espécies bacterianas, incluindo em *P. aeruginosa* (TANAKA et al., em 2010).

Salcedo et al. (1997) examinaram se o tratamento com IVIG poderia ser eficaz em pacientes com colite pseudomembranosa grave que não respondem a terapia antimicrobiana padrão. Neste estudo, os dois pacientes responderam rapidamente demonstrando diminuição da diarreia, do desconforto abdominal e da distensão. Todas as preparações de imunoglobulinas testadas continham IgG contra toxinas A e B do *Clostridium difficile* que neutralizou a atividade citotóxica *in vitro* em concentrações de IgG de 0.4-1.6 mg/mL. Neste estudo, os autores concluíram que a imunoterapia passiva com IVIG pode ser uma útil adição para a terapia antibiótica para colite pseudomembranosa grave e que a antitoxina IgG está presente em preparados de imunoglobulina padrão, com atividade neutralizante encontrados em diferentes concentrações de IgG, facilmente conseguidas no soro por administração de IVIG.

O estudo realizado por Laupland (2002) analisou a lógica e evidências para o uso de IVIG para a profilaxia e tratamento de infecções em pacientes adultos em estado crítico, em estudos dos tipos: prospectivo, randomizado e ensaios clínicos controlado com placebo. Estes estudos demonstraram taxas de incidência mais baixa de infecção com o tratamento profilático com a IVIG, especialmente nos casos de pneumonia pós-cirúrgica entre pacientes criticamente doentes. Porém, esses estudos não mostraram diminuição significativa da mortalidade devido à terapia com IVIG e tiveram reduções variáveis no uso de antimicrobianos e no tempo de internação em UTI. Este estudo concluiu que o tratamento com IVIG como adjuvante é promissor, mas é ainda conflitante, necessitando de maior aprofundamento em suas pesquisas.

Tanaka et al., em 2010 realizaram estudo utilizando uma cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenênicos. Demonstraram que após a incubação da cepa com a IVIG no soro humano diminuiu a contagem de células bacterianas em comparação com o carbapenêmico meropenem, em menos tempo. Também foram observadas nas células bacterianas, alterações morfológicas como a formação de células bacterianas redondas, esferoplastos e protuberâncias quando submetido ao meropenem. As células que não estavam em fase de crescimento logarítmico não apresentaram essas alterações morfológicas. Em contraste, no tratamento com soro, ocorreu a coagulação das células bacterianas após 1 minuto em ambas as fases, as células sofreram lise entre 10 e 30 minutos induzida pelos anticorpos presentes no soro. Adicionalmente, quando *P. aeruginosa* foi incubada juntamente com soro depletado de IgG, a lise bacteriana e a deposição deste anticorpo não foram observadas.

Saito et al. (2011) também examinaram a eficácia da IVIG em *Clostridium difficile toxin* (CDT) - medida pela letalidade e lesão celular em camundongos BALB/c. Todos os camundongos do grupo controle morreram dois dias após a injeção do preparado de CDT. Os efeitos máximos de IVIG (100 % de sobrevivência) foram observados quando os camundongos foram tratados com IVIG ao mesmo tempo em que a injeção de CDT. Os efeitos IVIG estavam intimamente associados com a melhora da permeabilidade vascular intestinal e danos na mucosa do intestino. Além disso, a redução de um marcador de apoptose (fragmentos de DNA associada à histona) foi demonstrada em camundongos tratados com IVIG, demonstrando que a IVIG pode ser protetora contra letalidade do CDT, quando administrada no momento adequado. Estes autores sugeriram também um aumento da permeabilidade intestinal.

Farag et al. (2013) investigaram o efeito *in vitro* da IVIG na capacidade dos neutrófilos humanos em fagocitar e matar isolados de *S. aureus* com perfil de resistência a meticilina (MRSA), utilizando o ensaio de MTT e determinando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Também avaliaram a eficiência da IVIG na neutralização da α -hemolisina e coagulase dos MRSA e a capacidade de IVIG no tratamento e prevenção de infecções por isolados MRSA em camundongos Swiss albinos, com peritonite. Demonstraram que a IVIG aumentou significativamente de 30-80% a morte de MRSA por neutrófilos em todas as concentrações testadas (0,1-5 mg/mL). Aumentou significativamente a produção de ROS e NO, este último de maneira dose dependente de IVIG. Além disso, IVIG reduziu significativamente em 10 vezes a atividade hemolítica de MRSA e a sua capacidade de coagulação por 50%. Quando testado *in vivo*, os grupos que receberam IVIG por infusão na veia da cauda não mostraram melhoria significativa na sua sobrevivência, enquanto que os que receberam o IVIG no mesmo local da infecção apresentaram uma melhoria da sobrevivência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar, em isolados clínicos de *A. baumannii*, a ação da combinação de antimicrobianos (meropenem, amicacina e colistina) e descrever as possíveis alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* pela IGIV com e sem soro humano em associação com os antimicrobianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de resistência por Concentração Inibitória Mínima de *A. baumannii* ao meropenem, amicacina e colistina;
- Determinar a ação da associação do meropenem com amicacina e colistina frente *A. baumannii*;
- Analisar a variação da taxa de fagocitose *in vitro* dos monócitos humanos infectados por *A. baumannii* submetidos à IGIV isolada e em combinação com meropenem/amicacina e meropenem/colistina em concentrações sub-sinérgicas;
- Descrever as alterações ultraestruturais em *A. baumannii* causadas *in vitro* pela IGIV isolada e em combinação com meropenem/amicacina e meropenem/colistina em concentrações sub-sinérgicas;
- Descrever as alterações ultraestruturais em *A.baummanii* causadas *in vitro* pela IGIV/Soro humano isoladamente e em combinação com meropenem/amicacina e meropenem/colistina em concentrações sub-sinérgicas;
- Verificar a ligação *in vitro* da IGIV à superfície de *A. baumannii* submetidos ao meropenem/amicacina e meropenem/colistina em concentrações sub-sinérgicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Inicialmente foram utilizados 10 isolados bacterianos da espécie de *A. baumannii* provenientes de dois hospitais públicos da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014. Todos os isolados foram identificados e seus perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos foram determinados pelo sistema automatizado VITEK 2 (*BioMérieux*) (TABELA 1). Para o estudo foram selecionados isolados por apresentarem diferentes perfis clonais, genes de resistência e virulência (CAVALCANTI et al. 2016).

TABELA 1. Caracterização e perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Acinetobacter baumannii*.

Isolados	Hosp.	Isolamento	Setores	Perfis de Resistência
54	B	Cateter	UTI	AK, SAM, CPM, CAZ, CRO, CIP, COL, GM, IMI, MEM
113	A	Ponta de cateter	UTI	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
119	A	Sec. Traqueal	UTI	CFX, CFX/AX, MEM
165	A	Escara	UTI	AMO/AC, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
322	A	LCR	USAN	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
379	B	Líqu. cav.abdominal	UTI	AK, CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM
513	A	Hemocultura	UTI	CTX, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
570	B	Sangue	UTI	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
808	A	LCR	UTI pediátrica	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, XFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
829	A	Sec. Região tórax	UTQ Adulto	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT

LCR: Líquido Cefalorraquidiano; CTX: Cefotaxima; CPM: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; PRL: Piperaciclina; CFX/AX: CefuroximaAxetil; SAM: Ampicilina; CRO: Ceftriaxona; AMO/AC: Amoxicilina/Ácido Clavulânico; COL: Colistina; LEV: Levofloxacina; NFT: Nitrofurantoína; AK: Amicacina; TN: Tobramicina; TS: Trimetoprim-Sulfametoxazol; CFX: Cefuroxima.

4.2 ANTIMICROBIANOS E IGIV

Os antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina foram adquiridos comercialmente da *Sigma-Aldrich*. A Imunoglobulina G Intravenosa Humana (IGIV) é um *pool* preparado de IgG policlonal humana, comercialmente disponível como Endobulin

Kiovig Imunoglobulina Intravenosa pela Baxter International Inc. Brasil, fornecido como solução injetável a 10%.

4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Foi determinada, para os dez isolados de *A. baumannii*, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos amicacina, meropenem e colistina. Os isolados bacterianos foram inoculados e reativados em 1 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e mantidos por 18 h em estufa bacteriológica a 37°C. Esta suspensão bacteriana foi comparada e ajustada a escala 0.5 de McFarland, correspondente a 10^8 UFC/mL.

Em uma placa de cultura foi realizada a microdiluição seriada 1:1 em caldo Mueller Hinton, adicionando-se o antimicrobiano no primeiro poço da placa para atingir a concentração final desejada. A partir deste primeiro poço foi realizada a microdiluição seriada. Por fim, em cada poço da placa de cultura com a microdiluição dos antimicrobianos, foi adicionado, 1 µL da suspensão bacteriana ajustada. A placa final foi incubada a 37°C em estufa por 18 h, sendo posteriormente verificada a presença de crescimento bacteriano, por meio da visualização da turbidez, para determinar a CIM.

O teste de microdiluição em caldo foi realizado em triplicata técnica, seguindo as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI 2018) e utilizando a cepa de referência de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle de qualidade.

4.4 CHECKERBOARD

Para determinar a efeito da associação dos antimicrobianos (meropenem com amicacina e meropenem com colistina) nos 10 isolados de *A. baumannii* foram realizados testes de microdiluição combinada, em placa de 96 poços. As microdiluições seriadas partiram da concentração inicial de 2x a CIM para os antimicrobianos, determinadas na etapa anterior. Porém agora realizada com a associação dos antimicrobianos.

Anteriormente a cada experimento os isolados foram reativados. E no momento do experimento foram ajustados à escala de 0.5 de McFarland e posteriormente diluídos para a concentração em escala de 10^5 UFC/mL. Em seguida, foi adicionada a suspensão bacteriana ajustada em cada poço da placa com a microdiluição. Por fim, as placas foram incubadas a \pm 37°C e avaliadas após 20-24 h. Os testes foram realizados em triplicata técnica e realizados segundo protocolo descrito por Pillai; Moellering; Eliopoulos, (2005) e Leite et al. (2015).

Após a incubação, qualquer poço apresentando turbidez foi considerado com crescimento microbiológico, em seguida, foi calculado o Índice Fracionário de Concentração Inibitória (ICIF) utilizando a Concentração Inibitória Fracional (CIF) para cada fármaco.

$$\text{ICIF} = \text{CIF A combinado} / \text{CIF A} + \text{CIF B combinado} / \text{CIF B}$$

Os resultados foram interpretados de acordo com Pillai; Moellering; Eliopoulos (2005): sinergismo se $\text{ICIF} \leq 0.5$; aditivo se $\text{ICIF} > 0.5$ e ≤ 1 ; indiferente se $\text{ICIF} \geq 1.0$ e ≤ 4 ; e antagonismo se $\text{ICIF} > 4.0$.

4.5 SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a MEV foram selecionados quatro isolados de *A. baumannii* utilizando como critério de inclusão, as diferentes observações das CIM isoladamente e em associação: o isolado mais resistente (808) aos antimicrobianos avaliados; o isolado mais sensível (119); o isolado com diminuição da CIM do meropenem, quando combinado com amicacina (322); e o isolado com diminuição da CIM do meropenem, quando combinado com colistina (165) (FIGURA 9). A seleção das concentrações para as etapas seguintes foram: concentrações sub-sinérgicas e que também são \leq ao *breakpoint* para meropenem, amicacina e colistina, segundo o CLSI (2018) (TABELA 2).

FIGURA 9 - Organograma da seleção dos isolados de *Acinetobacter baumannii*

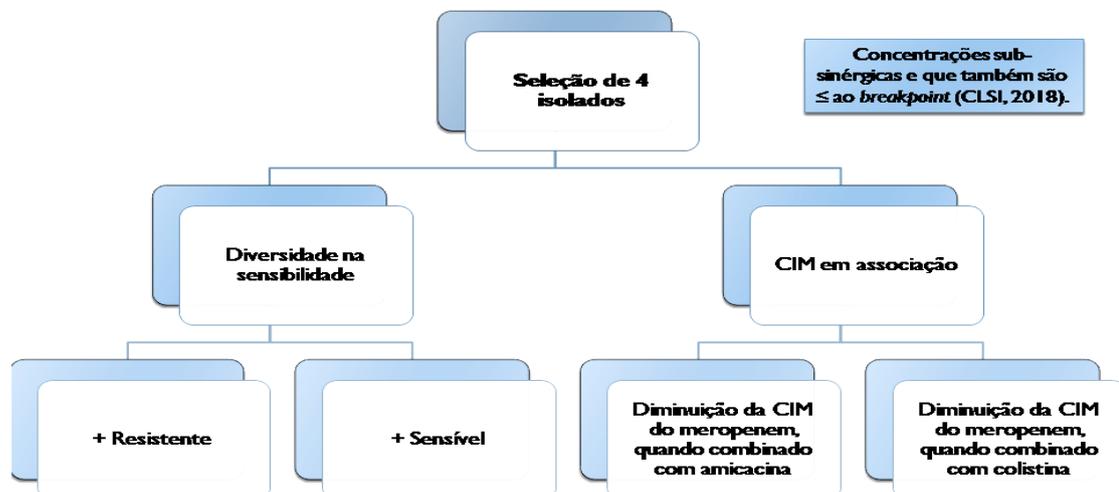


TABELA 2: Seleção dos isolados de *Acinetobacter baumannii*

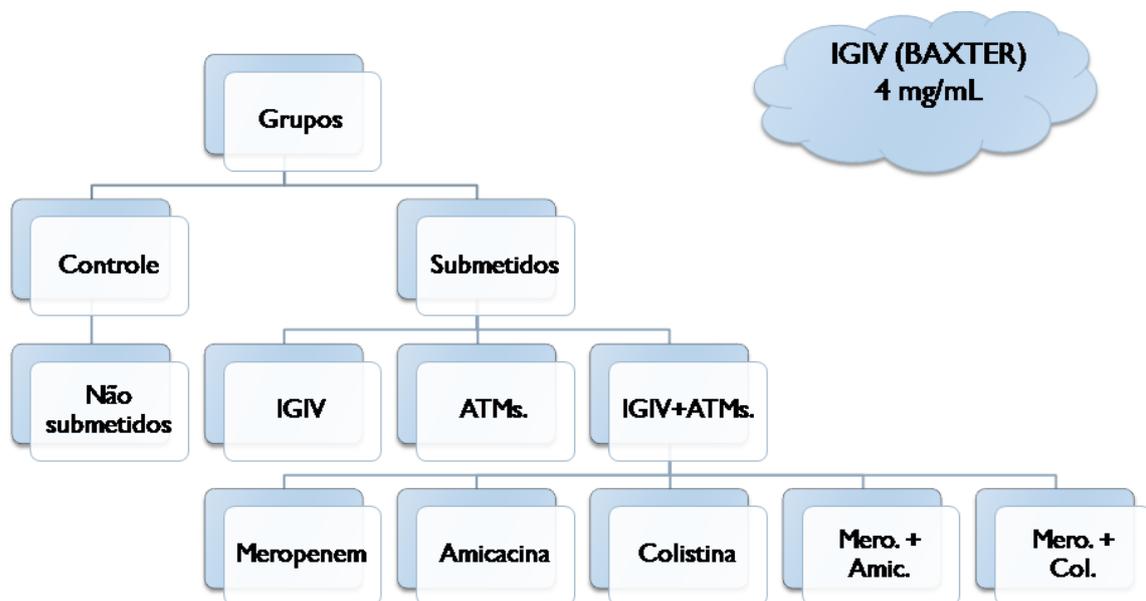
Isolados	Concentrações sub-sinérgicas ($\mu\text{g/mL}$)					
	Meropenem	CIM	Colistina	CIM	Amicacina	CIM
119	0.031	0.5(S)	0.062	1(S)	0.062	1(S)
165	4	64 (R)	0.062	1(S)	1	16(S)
808	4	64 (R)	0.250	4(I)	2	32(S)
322	8	128 (R)	0.125	2(S)	1	16(S)

CIM – Concentração Inibitória Mínima; S – Sensível; I – Intermediária; R - Resistente. Interpretação segundo o CLSI, 2018.

4.6 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

Os quatro isolados de *A. baumannii* selecionados (TABELA 2) foram reativados e posteriormente ajustados à escala 0.5 McFarland. Em uma microplaca contendo caldo Muller Hinton, cada isolado foi submetido separadamente a 4mg/mL de IGIV, meropenem, amicacina e colistina. Também em associação de IGIV com cada antimicrobiano (IGIV + meropenem, IGIV + amicacina e IGIV + colistina), IGIV com meropenem + amicacina e IGIV com meropenem + colistina (FIGURA 10). Para cada isolado, foi incluído um controle sem a presença dos antimicrobianos ou IGIV. No final, foi adicionada a suspensão bacteriana ajustada à escala 0.5 de McFarland.

FIGURA 10 - Organograma dos grupos experimentais



4.7 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA MEV

Os isolados foram submetidos às concentrações apresentadas na tabela 2. Posteriormente processados para MEV, objetivando determinar os efeitos ultraestruturais dos antimicrobianos e IGIV nos isolados de *A. baumannii*. Para isso, as células bacterianas foram centrifugadas, lavadas em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4 e fixadas em Karnovsky (tampão fosfato 0.1M, glutaraldeído 2.5% e formaldeído 4%) por 2 h para posterior processamento de rotina específico para MEV de acordo com Veras et al. (2015). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico JOEL JSM-5600 LV.

4.8 SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA TAXA DE FAGOCITOSE, MEV COM SORO HUMANO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Dois isolados clínicos MDR de *A. baumannii* foram selecionados com base no perfil de sensibilidade a meropenem, amicacina e colistina, associados à presença de alterações morfológicas: o isolado 808 apresentou resistência ao meropenem e resistência intermediária aos outros antimicrobianos, como também apresentou menor número de alterações morfológicas. Já o isolado 119 apresentou sensibilidade aos três antimicrobianos e a presença de mais alterações morfológicas, quando ambos foram submetidos à IGIV isoladamente ou associada aos antimicrobianos, sem a presença do soro humano.

4.9 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

A obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi realizado segundo o protocolo de Lorena et al. (2008). O sangue (50 mL) coletado em tubos com heparina foi misturado à solução salina com fosfato (PBS) pH 7,2 (1:1). Em seguida, foram distribuídos em tubos Falcon contendo Ficoll-Hipaque (GE HEALTHCARE) e centrifugados por 30 min a 900 g. Após a centrifugação, as células do PBMC foram retiradas, lavadas e centrifugadas por 2 vezes (1 vez PBS + 1 vez meio RPMI incompleto). Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo (RPMI + Soro Fetal Bovino), diluídas em azul de Trypan para a realização da contagem em Câmara de Neubauer.

4.10 TAXA DE FAGOCITOSE

Em placas de 24 poços, contendo em cada poço lamínulas de vidro redondas de 13 mm, 1×10^6 de células obtidas do PBMC foram incubadas durante 2 h em atmosfera de 5% de CO₂ para adesão das células a superfície das lamínulas. Posteriormente, as suspensões bacterianas descritas no subitem 4.6 foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI e ajustadas à concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram utilizadas para infecção das células do PBMC em cada poço. A placa resultante foi incubada em atmosfera de 5% de CO₂ por 1 h. Posteriormente à incubação, as lamínulas foram retiradas dos poços coradas e montadas para microscopia óptica. Os resultados foram expressos em porcentagem de células fagocíticas em uma contagem total de 100 células.

4.11 SORO HUMANO

O soro humano foi obtido da coleta de amostra sanguínea de um doador voluntário. O sangue foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm para a separação dos componentes sanguíneos e obtenção do soro. Para a etapa de microscopia eletrônica, os dois isolados descritos no subitem 4.8 foram submetidos a cada condição teste, apresentadas nas concentrações presentes na tabela 2, juntamente com 40% de soro humano.

4.12 ULTRAESTRUTURA DE *A. baumannii* SUBMETIDAS À IGIV, ANTIMICROBIANOS E SORO HUMANO

Para a determinação dos efeitos da IGIV + soro humano associado aos antimicrobianos na morfologia dos dois isolados de *A. baumannii*, estes foram submetidos às concentrações de antimicrobianos apresentadas na tabela 2, juntamente com 40% de soro humano. Em todos os processamentos foram incluídos um controle dos isolados sem a presença dos antimicrobianos ou IGIV + soro humano. O processamento das amostras foi realizado como descrito no subitem 4.7.

4.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para verificar a ligação da IGIV com a célula bacteriana de *A. baumannii*, as suspensões bacterianas descritas no subitem 1.9, que foram submetidas à IGIV isoladamente

ou em combinação aos antimicrobianos, foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato a 1M, e ajustadas à concentração de 1.5×10^8 UFC/mL. Foram utilizadas como controles, as células submetidas somente à IGIV e células não-submetidas. O processamento foi realizado segundo protocolo do ensaio sorológico de Imunofluorescência Indireta (IFI) do Instituto de tecnologia e imunobiológicos (BIO-MANGUINHOS). Foram distribuídos 15 μ L desta suspensão bacteriana referente a cada teste, em lâminas específicas para imunofluorescência e postas para secar durante 2 h em estufa a 37°C. Em seguida, as células foram incubadas com anti-IgG conjugada com FITC por 30 min. Posteriormente, foram lavadas, secas, montadas com prolong Diamond (ThermoFisher) para visualização em microscópio de imunofluorescência Axio (Zeiss).

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, a análise de variância (ANOVA) para a comparação das médias entre os diferentes grupos experimentais. Quando os resultados da ANOVA revelaram diferença estatisticamente significativa, foram realizados os testes de significância de Turkey's para comparar a taxa de fagocitose produzida por monócitos desafiados com bactérias tratadas em relação ao controle (sem tratamento), e entre os grupos testes. Os resultados foram expressos em média. A significância foi definida por $p < 0.05$.

4.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE) sob parecer favorável de número CAAE: 39858214.2.0000.5208. Foi coletada amostra sanguínea de doador voluntário que consentiu sua participação neste estudo, por meio de assinatura do Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE).

4.16 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde-PAPES VI (Process no.407826/2012-2), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1: ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS CAUSADAS PELA COMBINAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA COM MEROPENEM, AMICACINA E COLISTINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista associado ao aumento da morbimortalidade em Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS). O uso combinado de antimicrobianos, como meropenem, amicacina e colistina, têm sido utilizados como alternativa para graves infecções causadas por isolados multidroga-resistentes (MDR) de *A. baumannii*, devido à redução drástica das opções terapêuticas, dificultando o tratamento. Contudo, essas combinações nem sempre são eficazes para combater isolados severamente resistentes, sendo necessária a busca de novas alternativas para o tratamento destas infecções. O uso empírico de imunoglobulina G intravenosa humana (IGIV) associada a antimicrobianos em infecções bacterianas tem revelado resultados promissores, tendo em vista a ação imunomoduladora da IGIV ao invés da reposição de imunoglobulina. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a ação combinada de antimicrobianos e descrever as alterações ultraestruturais causadas em isolados MDR de *A. baumannii* quando submetidos à IGIV isoladamente e em combinação com colistina, meropenem e amicacina. Foi determinada a Concentração Inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos (meropenem, amicacina e colistina) em 10 isolados MDR de *A. baumannii*, seguida pela análise por checkerboard. Foram selecionados quatro isolados de *A. baumannii*, os quais foram submetidos à 4mg/mL de IGIV humana isoladamente e em combinação com diferentes sub-CIM sinérgicas dos antimicrobianos avaliados. Posteriormente, foram processados para microscopia eletrônica de varredura. Nove isolados bacterianos apresentaram resistência ao meropenem. Para a colistina, dois isolados apresentaram susceptibilidade intermediária e os demais foram sensíveis. E para amicacina, quatro isolados exibiram susceptibilidade intermediária e os demais foram sensíveis ao antimicrobiano. Foram observadas concentrações sinérgicas em cinco dos dez isolados avaliados nas combinações de meropenem com amicacina e meropenem com colistina. Quando submetido à IGIV e a sub-CIM de meropenem, amicacina e colistina, as células bacterianas apresentaram diversas

alterações morfológicas, como alongamento celular, rugosidade de membrana, ruptura celular, divisão celular incompleta, presença de “bolhas” na superfície celular e “depressão” na membrana. Os isolados de *A. baumannii* apresentaram alta resistência ao meropenem, sendo observadas diferentes concentrações com ação sinérgica entre antimicrobianos avaliados. Além disso, foi possível verificar *in vitro* que a IGIV associada a antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina é uma alternativa altamente promissora no combate de infecções por *A. baumannii* MDR, visto os danos causados na morfologia da célula bacteriana, os quais foram similares aos danos provocados pelas combinações de antimicrobianos. Assim, estes dados dão suporte à continuação do uso empírico e estimula análises *in vivo* com IGIV para a busca de novas opções terapêuticas de IRAS.

Palavras-chaves:

Acinetobacter baumannii. Imunoglobulina intravenosa. Concentração inibitória mínima, Checkerboard. Microscopia eletrônica.

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno oportunista hospitalar, encontrado em todo o mundo e envolvido em Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS), sendo responsável por infecções cada vez mais comuns nas últimas décadas, levando ao aumento da morbimortalidade e elevadas taxas de mortalidade, variando de 5% em pacientes em enfermarias gerais a 52% em pacientes sob cuidados intensivos (FUJIKURA et al., 2016; FAM et al., 2017; AHMAD et al., 2019).

Os isolados de *A. baumannii* são responsáveis por diversas infecções, incluindo pneumonia, bacteremia, infecções do trato urinário, meningite, entre outras (FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; AHMAD et al., 2019). O tratamento dessas infecções pode ser dificultado pelo aumento da resistência antimicrobiana de *A. baumannii*, não existindo um comportamento clínico definido para o tratamento das infecções causadas por *Acinetobacter* spp. multidroga-resistente (MDR) (MARAGAKIS; PERL, 2008; DOI; MURRAY; PELEG, 2016, ELHOSSEINY; ELHEZAWY; ATTIA, 2018). A amicacina é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos que apresenta um amplo espectro de ação, podendo ser usado em infecções por bacilos Gram-negativos resistentes à gentamicina e na terapia empírica de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) por *A. baumannii* (ANVISA, 2015). Os carbapenêmicos são comumente considerados mais seguros e eficientes, assumindo um

grande papel no tratamento de graves infecções causadas por bactérias MDR (ARROYO et al., 2011; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017). Contudo, o aparecimento de isolados resistentes aos carbapenêmicos tem reduzido consideravelmente as opções terapêuticas atuais (ZARRILLI et al., 2009; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017).

A ação de combinações de agentes antimicrobianos, como carbapenêmicos com outras classes de antimicrobianos, tem demonstrado eficiência no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* com moderada resistência, porém o uso combinado não tem sido eficiente em isolados MDR (FOURNIER; RICHET, 2006; FAM et al., 2017). Ainda assim, alguns estudos confirmam que a ação combinada mesmo não sendo efetiva pode provocar alterações morfológicas nas células bacterianas quando submetidas às sub-concentrações inibitórias mínimas (sub-CIM) (DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010, VERAS et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016; EALES et al., 2018). Já para cepas pandroga-resistentes (PDR), a última alternativa que ainda pode surtir efeito como fármaco é a colistina, principalmente em infecções severas, tais como meningites, pneumonia ou bacteremia (FAM et al., 2017, DAFOPOULOU et al., 2019). No entanto, o surgimento de resistência a colistina e a alta prevalência de nefrotoxicidade, seu principal efeito adverso, pode tornar inadequada a utilização das polimixinas no tratamento de infecções por *A. baumannii*, evidenciando assim a necessidade de busca por novas opções para a terapia de infecções graves (FOURNIER; RICHET, 2006; FAM et al., 2017, RODRIGUEZ et al., 2019).

Alguns estudos visam diferentes estratégias para o tratamento de infecções bacterianas, que pode incluir infecções por *A. baumannii* MDR, sem acarretar severos efeitos colaterais, como toxicidade de alguns antimicrobianos. A Imunoglobulina G Intravenosa Humana (IGIV) são preparações compostas de um pool de Imunoglobulinas G (IgG), que inicialmente eram utilizadas para a reposição de IgG, mas devido a sua função imunomoduladora, essas preparações vem sendo aproveitada no tratamento de diferentes infecções. As IGIV têm sido associadas a diferentes antimicrobianos no tratamento empírico de infecções graves e vem mostrando resultados promissores; porém, ainda há dúvidas sobre a atividade biológica *in vitro* dessa associação, frente a isolados bacterianos (SALCEDO et al., 1997; LAUPLAND, 2002; TANAKA et al., 2010; YE et al., 2018).

Tanaka et al. (2010) realizaram um estudo *in vitro* utilizando uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos e comprovaram que a IGIV isolada ocasionou efeitos prejudiciais na morfologia celular de forma mais rápida e intensa, como a formação de esferoplastos, perda de material citoplasmático e coagulação das células

bacterianas, em comparação ao meropenem. No entanto, os efeitos causados pela associação de antimicrobianose IGIV humana, ainda não foram esclarecidos. Em uma espécie bacteriana diferente Farag et al. (2013) verificou que dependente da dose de IGIV, houve um maior aumento da fagocitose de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) por neutrófilos. Porém, nestes estudos não foram demonstrados os efeitos causados em células bacterianas quando submetidas à IGIV associada com antimicrobianos.

Visto as questões ainda existentes referentes ao uso da IGIV humana combinada com antimicrobianos como alternativa terapêutica para tratamento de IRAS por *A. baumannii*, este estudo objetivou verificar a ação da combinação de antimicrobianos e descrever as alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* em isolados MDR de *A. baumannii* provenientes de IRAS, quando submetidos à IGIV isoladamente e em combinação com colistina, meropenem e amicacina, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de IRAS.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Foram utilizados 10 isolados bacterianos da espécie *A. baumannii* provenientes de hospitais públicos da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014. Todos os isolados foram identificados e seus perfis de resistência aos antimicrobianos foram determinados pelo sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux). Estes isolados foram selecionados com base em um estudo anterior e apresentam diferentes perfis clonais, genes de resistência e virulência (dados não publicados) (TABELA 1).

TABELA 1.: Caracterização e Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos isolados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de hospitais públicos da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014

Isolados	Hosp.	Isolamento	Setores	Perfis de Resistência
54	B	Cateter	UTI	AK, SAM, CPM, CAZ, CRO, CIP, COL, GM, IMI, MEM
113	A	Ponta de cateter	UTI	CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
119	A	Sec. Traqueal	UTI	CFX, CFX/AX, MEM
165	A	Escara	UTI	AMO/AC, CTX, CPM, CAZ, CIP, IMI, MEM, PRL
322	A	LCR	USAN	CTX, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
379	B	Líqu. cav.abdominal	UTI	AK, CPM, CAZ, CRO, CIP, GM, IMI, MEM
513	A	Hemocultura	UTI	CTX, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, LEV, NFT
570	B	Sangue	UTI	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
808	A	LCR	UTI pediátrica	SAM, CPM, CAZ, CRO, CFX, XFX/AX, CIP, GM, IMI, MEM
829	A	Sec. Região tórax	UTQ Adulto	CAZ, CRO, CFX, CFX/AX, CIP, COL, IMI, LEV, NFT

LCR: Líquido Cefalorraquidiano; CTX: Cefotaxima; CPM: Cefepima; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; PRL: Piperacilina; CFX/AX: CefuroxímaAxetil; SAM: Ampicilina; CRO: Ceftriaxona; AMO/AC: Amoxicilina/Ácido Clavulânico; COL: Colistina; LEV: Levofloxacina; NFT: Nitrofurantoína; AK: Amicacina; TN: Tobramicina; TS: Trimetoprim-Sulfametoxazol; CFX: Cefuroxíma.

2.2 ANTIMICROBIANOS E IGIV

Os antimicrobianos avaliados (meropenem, amicacina e colistina) foram adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich. A IGIV policlonal humana comercialmente disponível como EndobulinKiovig Imunoglobulina Intravenosa, pela Baxter International Inc. Brasil, fornecido como solução injetável a 10%.

2.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Foi determinada, para os dez isolados de *A. baumannii*, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobiano amicacina, meropenem e colistina. Os isolados bacterianos foram inoculados e reativados em 1 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e mantidos por 18 h em estufa bacteriológica a 37°C. Esta suspensão bacteriana foi comparada e ajustada a escala 0.5 de McFarland, correspondente a 10^8 UFC/mL. Em uma placa de cultura foi realizada a microdiluição seriada 1:1 em caldo Mueller Hinton, adicionando-se o antimicrobiano no primeiro poço da placa para atingir a concentração final desejada. A partir deste primeiro poço foi realizada a microdiluição seriada. Por fim, em cada poço da placa de

cultura com a microdiluição dos antimicrobianos, foi adicionado, 1µL da suspensão bacteriana ajustada. A placa final foi incubada a 37°C em estufa por 18 h, sendo posteriormente verificada a presença de crescimento bacteriano, por meio da visualização da turbidez, para determinar a CIM. O teste de microdiluição em caldo foi realizado em triplicata técnica, seguindo as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI 2018) e utilizando a cepa de referência de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle de qualidade.

2.4 CHECKERBOARD

A ação da associação dos antimicrobianos nos isolados de *A. baumannii* foi avaliada por microdiluição seriada em placa de 96 poços a partir de 2x a CIM dos antimicrobianos associados. Os 10 isolados foram reativados em caldo BHI e posteriormente os inóculos foram ajustados à escala de 0.5 de McFarland e em seguida diluídos para a concentração em escala de 10^5 e por fim, foram adicionados 30µL de cultura bacteriana, segundo protocolo descrito por Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005) e Leite et al. (2015). As placas foram incubadas a $\pm 37^\circ\text{C}$ e avaliadas após 20-24 h, sendo a turbidez o fator indicativo de crescimento microbiológico em triplicata técnica. Em seguida, foi calculado o Índice Fracionário de Concentração Inibitória (ICIF) utilizando a Concentração Inibitória Fracional (FIC) para cada fármaco. Os resultados foram interpretados de acordo com Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005): sinergismo se $\text{ICIF} \leq 0.5$; aditivo se $\text{ICIF} > 0.5$ e ≤ 1 ; indiferente se $\text{ICIF} \geq 1.0$ e ≤ 4 ; e antagonismo se $\text{ICIF} > 4.0$.

2.5 SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a MEV foram selecionados quatro isolados de *A. baumannii* utilizando como critério de inclusão as diferentes observações das CIM isoladamente e em associação: o isolado mais resistente aos antimicrobianos avaliados; o isolado mais sensível; o isolado com diminuição da CIM do meropenem quando combinado com amicacina; e o isolado com diminuição da CIM do meropenem quando combinado com colistina. A seleção das concentrações para as etapas seguintes foram: concentrações sub-sinérgicas e menor/igual (\leq) ao breakpoint para meropenem, amicacina e colistina, segundo o CLSI, 2018.

2.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA MEV

Os quatro isolados de *A. baumannii* selecionados foram reativados em caldo BHI por 18 h de incubação e posteriormente ajustados a escala de 0.5 de McFarland. Em placa de cultura, cada isolado foi submetido separadamente à 4mg/mL de IGIV, meropenem, amicacina e colistina. Além de submetidos à associação de IGIV com cada antimicrobiano (meropenem, amicacina e colistina), como também submetidos a associação da IGIV com meropenem + amicacina e IGIV com meropenem + colistina. Para cada isolado foi incluído um controle sem a presença dos antimicrobianos e/ou IGIV.

2.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os isolados foram submetidos as condições descritas no item 2.6 e posteriormente, foram processados para MEV para verificar as alterações ultraestruturais dos antimicrobianos e IGIV. Após a reativação em caldo BHI, as células bacterianas foram ajustadas a escala de 0.5 de McFarland, submetidas às condições-testes descritas no subitem 2.5 e incubadas a 37°C por 8 h. Após, as células foram centrifugadas, lavadas em tampão fosfato 0.1M, pH 7.4 e fixadas em Karnovsky (tampão fosfato, glutaraldeído 2.5% e formaldeído 4%) por 2 h para posterior processamento de rotina específico para MEV de acordo com Veras et al. (2015). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico JOEL JSM-5600 LV.

3 RESULTADOS

3.1 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Dos isolados bacterianos avaliados, apenas um apresentou sensibilidade ao meropenem (isolado 119), sendo os demais descritos como resistentes ao carbapenêmico. Para colistina, dois isolados apresentaram perfil de susceptibilidade intermediária (isolados 54 e 808) e os demais isolados foram sensíveis. Já para amicacina, quatro isolados apresentaram susceptibilidade intermediária (isolados 113, 570, 808 e 829) e os demais foram sensíveis ao antimicrobiano (TABELA 2).

TABELA 2: Concentração Inibitória Mínima dos isolados de *Acinetobacter baumannii* para os antimicrobianos meropenem, colistina e amicacina provenientes de hospitais públicos da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014

Isolados	CIM($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)		
	Meropenem	Colistina	Amicacina
54	64 (R)	4 (I)	16 (S)
113	64 (R)	1 (S)	32 (I)
119	0.5 (S)	1 (S)	1 (S)
165	64 (R)	1 (S)	16 (S)
322	128 (R)	2 (S)	16 (S)
379	128 (R)	2 (S)	16 (S)
513	128 (R)	2 (S)	2 (S)
570	128 (R)	1 (S)	32 (I)
808	64 (R)	4 (I)	32 (I)
829	128 (R)	2 (S)	32 (I)

CIM – Concentração Inibitória Mínima; S – Sensível; I – Intermediária; R - Resistente. Interpretação segundo o CLSI, 2018.

3.2 CHECKERBOARD

Na análise, foram observadas concentrações com efeito sinérgico em cinco dos dez isolados para as combinações de meropenem com amicacina (isolados 54, 113, 513, 570, 829), assim como, para as combinações de meropenem com colistina (isolados 113, 119, 165, 570 e 829). Nos isolados 113, 570 e 829 foram observados sinergismo nas duas combinações testadas (TABELA 3). Para os demais isolados testados, em ambas as combinações dos antimicrobianos, foram observadas efeito com ação aditiva. Dentre os cinco isolados onde houve ação com efeito aditivo para as combinações de meropenem com amicacina (isolados 119, 165, 322, 379 e 808) e combinações de meropenem com colistina (isolados 54, 322, 379, 513 e 808), os isolados 322, 379 e 808 apresentaram efeito aditivo simultaneamente nas duas combinações (TABELA 3). Em todos isolados foram observadas combinações dos antimicrobianos em concentrações com efeito indiferente. Nos dez isolados testados, em nenhuma concentração combinada foi observada ação antagônica entre os antimicrobianos.

Tabela 3: Análise das associações de antimicrobianos por checkerboard nos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

Isolados	CIM combinada ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)*							
	Meropenem e Amicacina				Meropenem e Colistina			
	Mero	Amic	ICIF	Ação	Mero	Coli	ICIF	Ação
54	2	1	0.09	Si	32	0.06	0.51	A
113	1	0.5	0.03	Si	1	0.02	0.02	Si
119	0,25	0.01	0.51	A	0.125	0.0062	0.31	Si
165	32	1	0.56	A	8	0.06	0.18	Si
322	2	8	0.51	A	64	0.5	0.75	A
379	64	8	1.0	A	2	2	1.0	A
513	32	0.12	0.31	Si	64	0.03	0.51	A
570	32	1	0.15	Si	32	0.01	0.26	Si
808	32	8	0.75	A	32	0.5	0.62	A
829	16	4	0.25	Si	4	0.12	0.09	Si

CIM – Concentração Inibitória Mínima; Mero – Meropenem, Amicacina – Amicacina, Coli – Colistina, ICIF - Índice Fracionário de Concentração Inibitória, Si – Sinérgica; A – Aditiva. Interpretação segundo Pillai; Moellering; Eliopoulos, 2005.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os isolados selecionados foram submetidos à IGIV isoladamente e associada aos antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina e avaliados por MEV, nas concentrações sub-sinérgicas apresentadas na Tabela 4. Foi observada que as células-controle de *A. baumannii* não submetidas aos antimicrobianos e IGIV demonstraram morfologia bacteriana conservada, com preservação da forma em cocobacilos e parede celular com aspecto íntegro (FIGURA 1A, 2A, 3A e 4A). As alterações morfológicas foram visualizadas e determinadas como qualquer modificação apresentada pela célula submetida em comparação com o controle.

Tabela 4: Seleção dos isolados de *Acinetobacter baumannii*

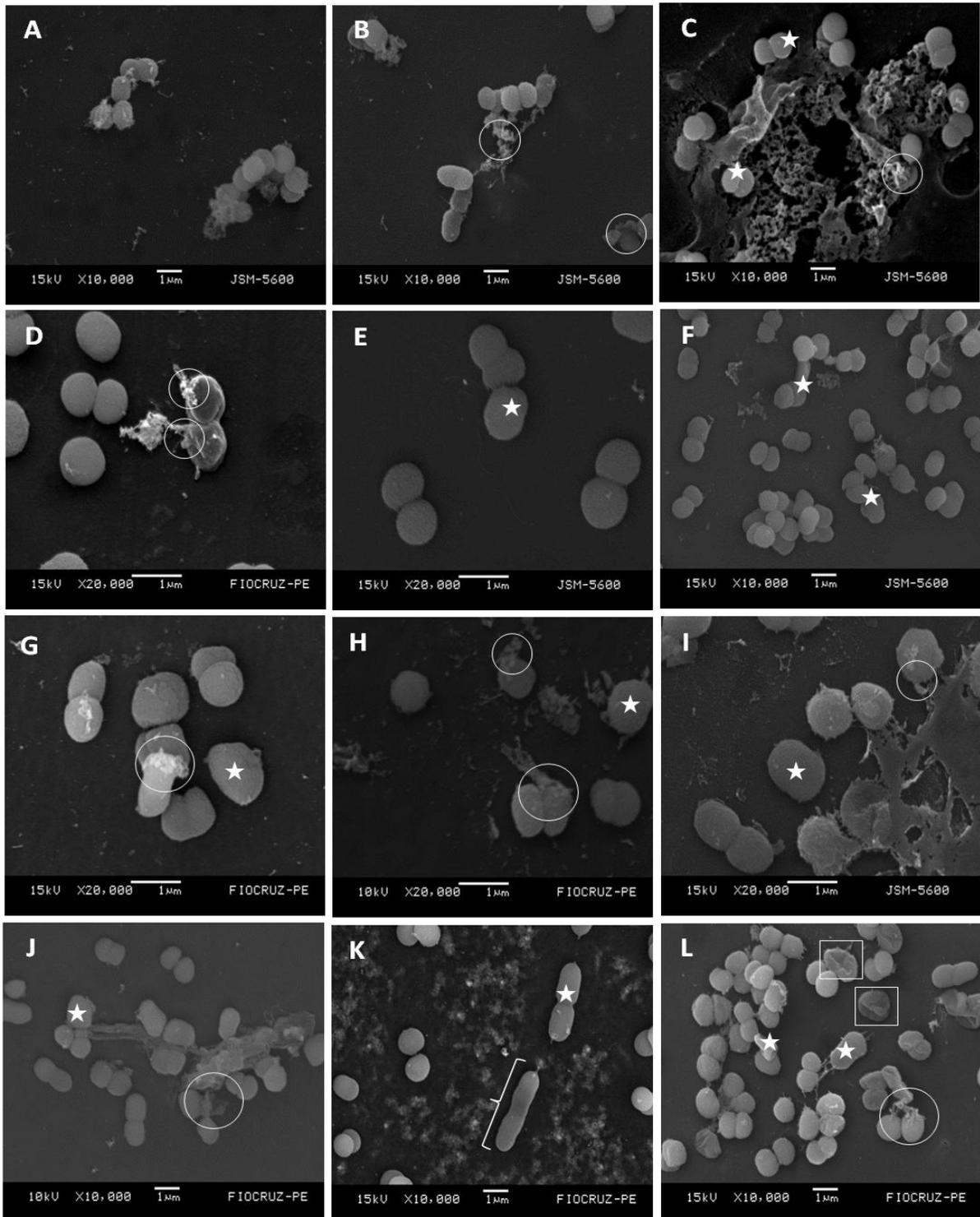
Isolados	Concentrações sub-sinérgicas ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)					
	Meropenem		Colistina		Amicacina	
	Sub-CIM	CIM	Sub-CIM	CIM	Sub-CIM	CIM
119	0.031	0.5(S)	0.062	1(S)	0.062	1(S)
165	4	64(R)	0.062	1(S)	1	16(S)
322	8	128(R)	0.125	2(S)	1	16(S)
808	4	64(R)	0.250	4(I)	2	32(S)

CIM – Concentração Inibitória Mínima; S – Sensível; I – Intermediária; R - Resistente. Interpretação segundo o CLSI, 2018.

Isolado 808

Este isolado apresentou ser o mais resistênte aos antimicrobianos avaliados. Contudo, quando submetido à IGIV associada à sub-CIM de antimicrobianos, apresentou poucas alterações morfológicas quando comparado ao controle (FIGURA 1A), sendo evidenciadas células com morfologia irregular, presença de ruptura celular com exposição do material citoplasmático, alongamento e depressão celular. Quando submetido à IGIV isoladamente, o isolado exibiu ruptura celular, além disso, esta alteração também foi visualizada na combinação de: IGIV com meropenem, meropenem com colistina, e meropenem com colistina. Também foi observado um alongamento celular ocasionado apenas pela submissão do isolado à meropenem e amicacina, e depressão na superfície celular quando exposto à IGIV, meropenem e amicacina (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Eletromicrografia de *Acinetobacter baumannii* do isolado 808.



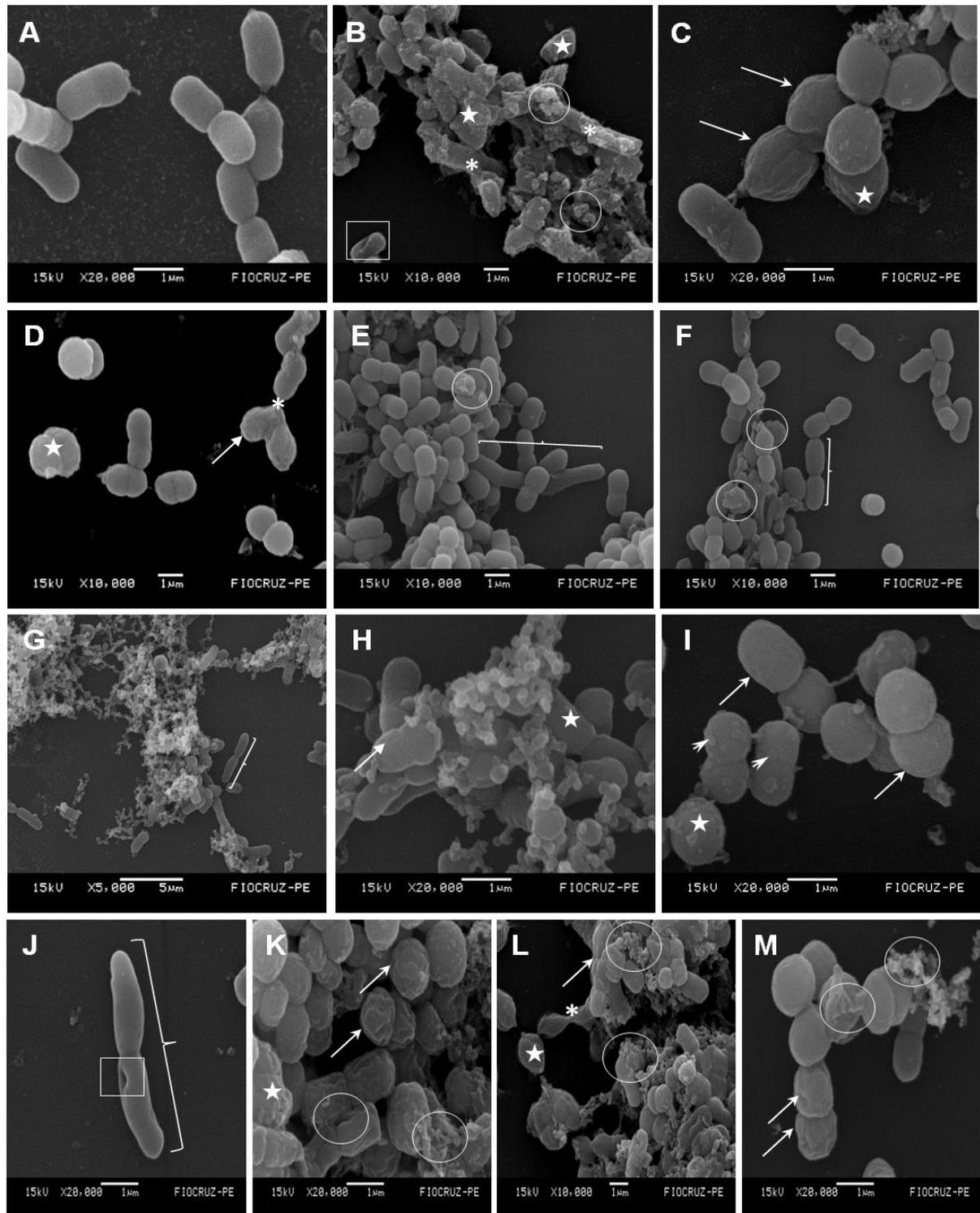
Fonte: O autor, 2018

(A) Células não tratadas com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; (B) Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV observa-se ruptura celular (círculo); (C) Células submetidas a 4 μg/mL de meropenem apresentando ruptura celular (círculo) e alteração na forma (estrela); (D) Células submetidas a IGIV/Meropenem apresentando ruptura celular (círculo); (E) Células submetidas a 0.25μg/mL colistina apresentando alteração morfológica (estrela); (F) células submetidas a IGIV/Colistina apresentando alteração na forma (estrela); (G) Células submetidas a meropenem e colistina apresentando ruptura celular (círculo) e alteração na forma (estrela); (H) células submetidas a IGIV, meropenem e colistina apresentando ruptura celular (círculo) e alteração na forma (estrela); (I) Células submetidas a 2 mg/μL amicacina

apresentando ruptura celular (circulo) e alteração na forma (estrela); **(J)** Células submetidas a IGIV/amicacina apresentando ruptura celular (circulo) e alteração na forma (estrela); **(K)** Células submetidas a meropenem e amicacina apresentando e alteração morfológica (estrela) e alongamento celular (colchete); **(L)** células submetidas a IGIV, meropenem e amicacina apresentando ruptura celular (circulo), alteração na forma (estrela) e depressão na superfície da membrana (quadrado).

Isolado 119

O isolado 119 exibiu sensibilidade aos três antimicrobianos testados. Quando submetido à IGIV e a sub-CIM de meropenem, amicacina e colistina, o isolado apresentou inúmeras alterações em sua morfologia, como: alongamento celular, devido à divisão celular incompleta; presença de bolhas na superfície celular, rugosidade, ruptura celular e depressão na membrana (FIGURA 2 A-M). A exposição à IGIV isoladamente, além de alterar a morfologia celular, também causou rugosidade e depressão na membrana e divisão celular incompleta (FIGURA 2B). Esta depressão também foi verificada na submissão à amicacina isolada (FIGURA 2J) e quando exposta à combinação de meropenem e colistina, provocou bolhas na superfície da membrana celular (FIGURA 2I).

FIGURA 2 - Eletromicrografia de *Acinetobacter baumannii* do isolado 119

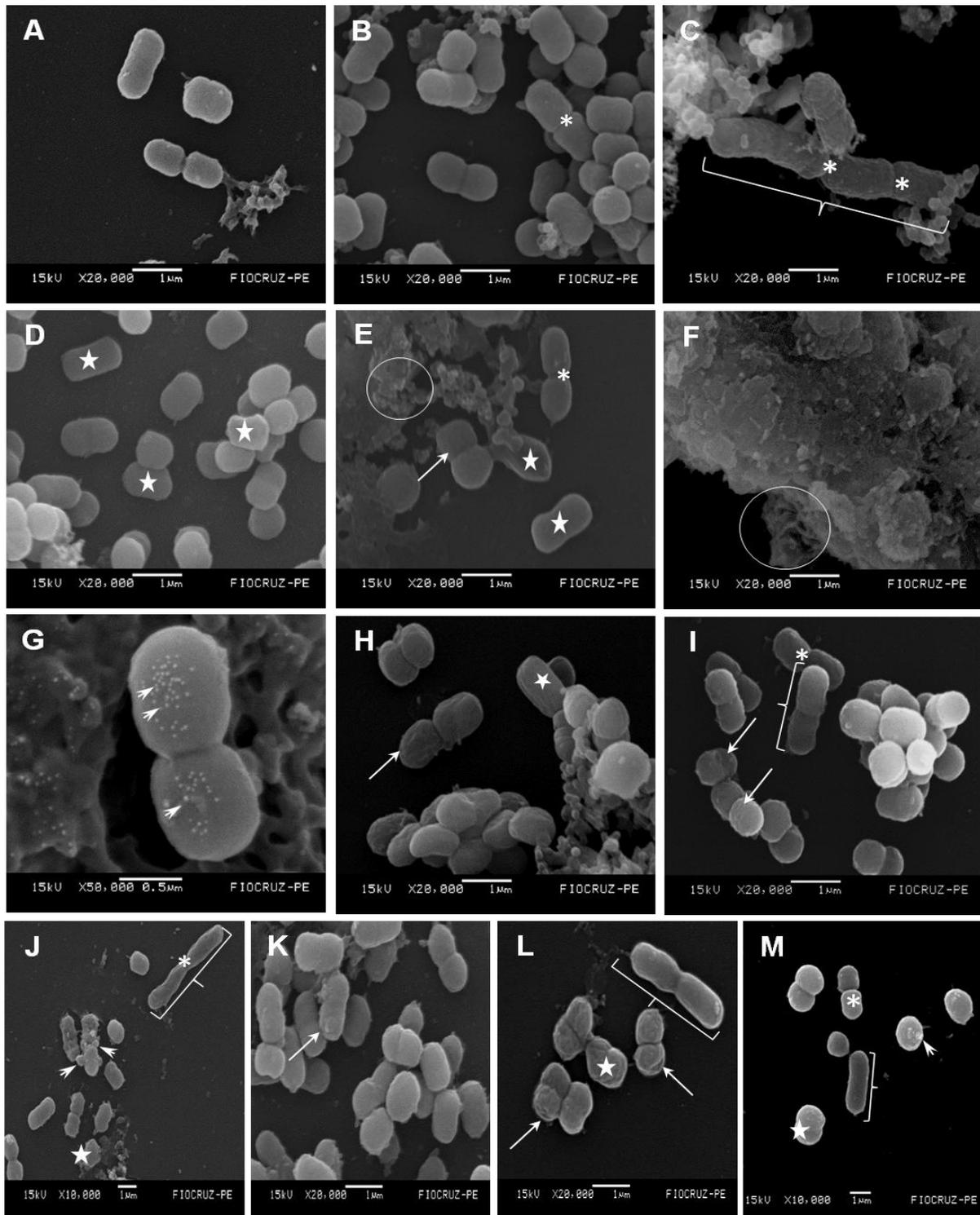
Fonte: O autor, 2018

(A) Células não tratadas com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; (B) Células submetidas a 4 mg/ μ L de IGIV observa-se células grumadas com alterações morfológica (estrela), divisão celular incompleta (asterisco), ruptura celular (circulo) depressão na superfície da membrana (quadrado); (C) Células submetidas a 0.031 μ g/mL de meropenem apresentando alteração morfológica (estrela) e enrugamento (seta) na superfície celular; (D) Células submetidas a IGIV/Meropenem com alteração na forma (estrela), divisão celular incompleta (asterisco) e enrugamento (seta) na superfície celular; (E e F) Células submetidas a 0.062 μ g/mL de colistina. Observar ruptura (circulo) e alongamento celular (colchete); (G) células submetidas a IGIV/Colistina apresentando alongamento celular (colchete); (H)

IGIV/meropenem/colistina apresentando alteração na forma (estrela) e enrugamento (seta); **(I)** Células submetidas a meropenem/colistina apresentando alteração morfológica (estrela), presença de bolhas (ponta de seta) e enrugamento (seta) na superfície celular; **(J)** Células submetidas 0.062 mg/μL amicacina. Observar alongamento celular (colchete) e depressão na superfície da membrana (quadrado); **(K)** células submetidas IGIV, meropenem e amicacina apresentando alteração na forma (estrela), ruptura (circulo) e enrugamento (seta) na superfície; **(L)** Células submetidas à IGIV/amicacina apresentando alteração na forma (estrela), divisão celular incompleta (asterisco), ruptura (circulo) e enrugamento (seta) na superfície; **(M)** Células submetidas a meropenem e amicacina apresentando ruptura (circulo) e enrugamento (seta) na superfície.

Isolado 322

Para este isolado, que apresentou grande redução da CIM do meropenem quando combinado com amicacina, também foram evidenciadas alterações morfológicas, tais como: rugosidade da membrana celular, alongamento e ruptura celular, divisão celular incompleta e presença de bolhas na superfície da célula (FIGURA 3 A-M). A submissão à IGIV isoladamente também provocou alteração na divisão celular, sendo considerada incompleta (FIGURA 3B). Quando submetido à IGIV/colistina, ocorreu ruptura celular total (FIGURA 3F). A presença de “bolhas” na superfície foi induzida pela exposição à meropenem/colistina, assim como IGIV/meropenem e IGIV/amicacina (FIGURA 3 G e J).

FIGURA 3 - Eletromicrografia de *Acinetobacter baumannii* do isolado 322

Fonte: O autor, 2018

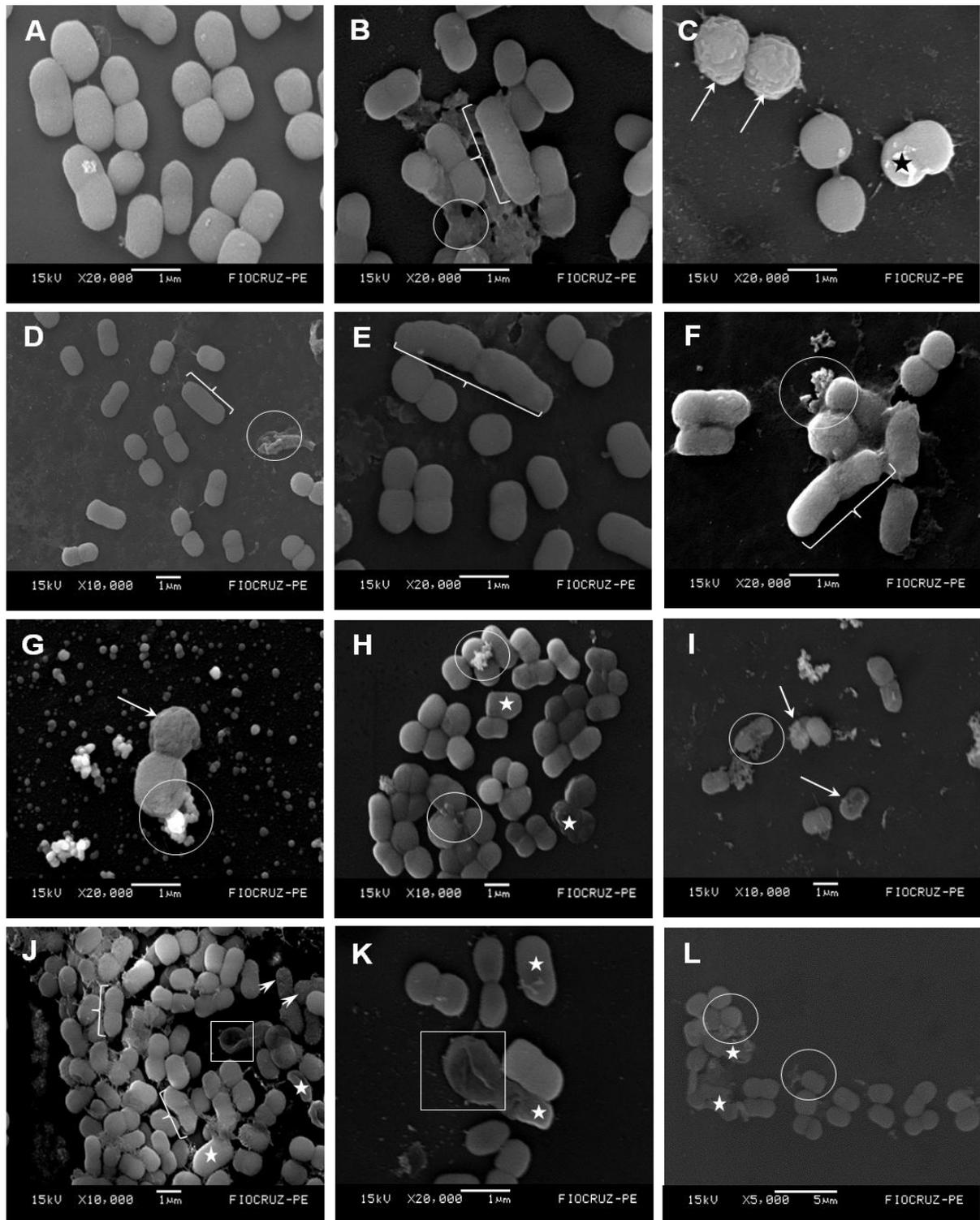
(A) Células não tratadas com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; (B) Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV observa-se divisão celular incompleta (asterisco); (C) Células submetidas a 8 µg/mL de meropenem apresentando celular incompleta (asterisco) e alongamento celular (colchete); (D) Células submetidas a IGIV/Meropenem apresentando alteração na forma (estrela); (E) Células submetidas a 2 µg/mL colistina apresentando ruptura celular (circulo), alteração na forma (estrela) e enrugamento (seta) na superfície; (F) células submetidas a IGIV/Colistina apresentando ruptura celular (circulo); (G) Células submetidas a meropenem e colistina apresentando a presença de bolhas (ponta de seta); (H) células submetidas a IGIV, meropenem e colistina apresentando alteração na forma (estrela) e enrugamento (seta) na

superfície; **(I)** Células submetidas a 16 mg/μL amicacina apresentando alongamento celular (colchete), divisão celular incompleta (asterisco) e enrugamento (seta) na superfície; **(J e K)** células submetidas a IGIV, meropenem e amicacina apresentando alteração na forma (estrela), divisão celular incompleta (asterisco), alongamento celular (colchete), presença de bolhas (ponta de seta) e enrugamento (seta) na superfície; **(L)** Células submetidas a IGIV/amicacina apresentando alteração na forma (estrela), alongamento celular (colchete) e enrugamento (seta) na superfície; **(M)** Células submetidas a meropenem e amicacina apresentando alteração na forma (estrela), alongamento celular (colchete) e divisão celular incompleta (asterisco).

Isolado 165

Este isolado, que apresentou grande diminuição da CIM do meropenem quando combinado com colistina, também apresentou alterações morfológicas em todas as submissões avaliadas. A exposição à IGIV e sub-CIM dos antimicrobianos causaram rugosidade na célula bacteriana e depressão na membrana, alongamento e ruptura celular (FIGURA 4 A-L). A submissão à IGIV isoladamente causou alongamento e ruptura celular, alterações, que também foram visualizadas quando submetido à IGIV/meropenem e IGIV/colistina (FIGURA 4B). As combinações IGIV/meropenem/amicacina e IGIV/amicacina provocaram depressão na superfície celular (FIGURA 4J e K), além disso, a submissão à IGIV/meropenem/amicacina causaram bolhas na membrana celular (FIGURA 4J).

FIGURA 4 - Eletromicrografia de *Acinetobacter baumannii* do isolado 165



Fonte: O autor, 2018

(A) células não tratadas apresentando tamanhos e morfologias preservadas; (B) células submetidas a 4mg/µL de IGIV, note presença de células alongadas (colchete) e outras apresentando ruptura (círculo) celular; (C) células submetidas a 4µg/mL meropenem apresentando alteração na forma (estrela) e enrugamento celular (seta); (D) células submetidas a IGIV/Meropenem, observe alongamento (colchete) e ruptura celular (círculo); (E) células submetidas a 0.062 µg/mL colistina observe alongamento celular (colchete); (F) células submetidas a IGIV/colistina note célula alongada (colchete) e ruptura celular (círculo); (G) células submetidas a meropenem e colistina, observe presença de poucas células com enrugamento (seta) e ruptura celular (círculo); (H) células submetidas a IGIV/meropenem/colistina apresentando alteração na forma (estrela) e extravasamento celular

(circulo); **(I)** células submetidas a 1µg/mL amicacina observe poucas células, algumas com enrugamento (seta) da superfície e ruptura celular (circulo); **(J)** células submetidas a IGIV, meropenem e amicacina note células com alteração na forma (estrela), alongamento celular (colchete), depressão na superfície da membrana (quadrado); e presença de bolhas (cabeça de seta) na superfície de algumas bactérias; **(K)** células submetidas a IGIV/amicacina é possível ver alteração na forma (estrela) e depressão na superfície da membrana (quadrado); **(L)** células submetidas a meropenem e amicacina note células com alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo).

4 DISCUSSÃO

A incidência de *Acinetobacter* spp. resistentes a múltiplos fármacos vem aumentando em diversas partes do mundo. Isto pode estar correlacionado à sua capacidade em causar surtos em pacientes com IRAS e colonizar inúmeros ambientes, incluindo superfícies abióticas (BREILH et al., 2013; FAM et al., 2017; VAARA, 2019). Esta alta resistência aos antimicrobianos também pode ser observado no presente estudo, no qual foi verificado que 90% dos isolados testados são resistentes à meropenem, 40% dos isolados com resistência intermediária à amicacina e 20% com resistência intermediária à colistina.

Em 2011, Viana et al. realizaram um estudo com 150 isolados de *A. baumannii* obtidos de um hospital em Londrina/Paraná/Brasil entre 1994-1996 (n = 48) e 2004-2007 (n = 102), onde verificaram o aumento da resistência destes isolados a diversos antimicrobianos utilizados na terapêutica, incluindo meropenem, amicacina e colistina. Segundo os autores, o aumento de isolados resistentes ao meropenem passou de 2% para 73% nos períodos analisados. Já os aminoglicosídeos mostraram baixa atividade *in vitro* contra isolados de *A. baumannii* em ambos os períodos (taxas de resistência para amicacina de 79% para 82%; gentamicina de 75% para 81%; e tobramicina de 73% para 76%) e para colistina, entre 1994-1996 não foram encontrados isolados resistentes, já entre os anos de 2004-2007, a taxa de resistência foi de 2%. Mostrando que ao passar dos anos, a resistência aos antimicrobianos vai aumentando e assim diminuindo as opções viáveis de antimicrobianos para a terapia, corroborando assim com os nossos achados.

Em 2018, no estudo desenvolvido por Shan et al. na China, foram obtidos 1.104 isolados bacterianos provenientes de 10 hospitais entre 2014 e 2015, dos quais 6% foram identificados como *A. baumannii*. Destes, cerca de 70% eram resistentes a meropenem e amicacina (61%). Recentemente, Jain et al. (2019) analisaram 36 isolados de *A. baumannii*, sendo 28 isolados clínicos e 8 isolados ambientais de Nova Deli/Índia. Houve um alto grau de resistência antimicrobiana em ambos os grupos, onde 96,4% das cepas clínicas era extensivamente droga-resistente (extensively drug-resistant - XDR) e entre as cepas ambientais, cerca de 50% foram XDR, 37,5% foram MDR e apenas uma cepa foi considerada sensível. A resistência ao meropenem e imipenem foi observada em 96,4% (cepas clínicas) e

87.5% (cepas ambientais), sendo que à amicacina, as cepas clínicas exibiram resistência em 96.4% e 50% das cepas ambientais, sendo todos os isolados sensíveis à colistina. Assim como, em trabalhos realizados no Brasil, como o nosso estudo, estes dois trabalhos realizados na Ásia demonstra a presença de grande resistência em isolados de *A. baumannii*.

O uso clínico de polimixinas havia sido abandonado, devido à nefrotoxicidade e porque fármacos de outras classes de antimicrobianos com melhor tolerância foram introduzidos. Contudo, em consequência da disseminação global de cepas bacterianas Gram-negativas extremamente resistentes aos antimicrobianos de uso, as polimixinas tornaram-se fármacos essenciais na terapêutica, especialmente para isolados de *A. baumannii* MDR (FOURNIER; RICHET, 2006; MAIFIAH et al., 2017; OMS, 2018; VAARA, 2019).

Apesar da colistina ainda apresentar efetividade contra cepas de resistência intermediária, a heterorresistência à colistina tem sido observada *in vitro* durante a terapêutica, aumentando preocupações no sentido de que a colistina sozinha possa não ter atividade suficiente a ser utilizada como monoterapia, pois nem sempre é possível gerar uma exposição plasmática para sua ação, devido à necessidade de altas concentrações do antimicrobiano, assim, o uso inconsciente de sub-CIM pode fazer emergir a resistência bacteriana a colistina. A colistina produz efeitos bactericidas rápidos em altas concentrações, porém tóxicos para os pacientes (LEITE et al., 2015; FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; VAARA, 2019).

Já existem relatos sobre resistência às polimixinas, e este fato tem se tornado um significativo problema de saúde pública mundial, isto pode ser resultado de alterações da membrana externa, ativação de bomba de efluxo ou aparecimento de genes móveis. Nas concentrações mais baixas, a colistina pode afetar a membrana externa bacteriana e aumentar a permeabilidade de bactérias Gram-negativas, o que facilita a capacidade de penetração de outros compostos combinados, resultando em potente atividade sinérgica. Mostrando a importância do uso combinado de antimicrobianos ou outras substâncias pra infecções por isolados MDR (MARAGAKIS; PERL, 2008; ARROYO et al., 2011; LEITE et al., 2015; FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; OMS, 2018; VAARA, 2019).

Alguns estudos relatam que a combinação de antimicrobianos se tornou uma das estratégias mais utilizadas no tratamento de graves infecções por *A. baumannii* (CAE et al., 2017; MAIFIAH et al. 2017). Segundo Bae et al. (2016), ao analisar nove isolados de *A. baumannii* (PDR e XDR) resistentes à colistina obtidos na Coreia do Sul entre 2010 a 2012, verificaram que a combinação de colistina com outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, carbapenêmicos, penicilinas ou cefalosporinas apresentou maior eficácia

nos testes de combinações. Já no estudo de Bremmer et al. (2016), também avaliando o uso combinado *in vitro* de antimicrobianos, analisaram 76 isolados clínicos de *A. baumannii* XDR em Ohio/Estados Unidos. Os autores confirmaram que combinações de minociclina-colistina, doripenem-colistina-minociclina e doripenem-colistina exibiram sinergia em 6.6%, 6.6% e 5.3% dos isolados, respectivamente. A tigeciclina-colistina foi à única combinação que não exibiu efeito sinérgico contra quaisquer isolados, havendo antagonismo em 13.2% dos isolados testados. Minociclina-colistina e doripenem-colistina-minociclina inibiram o crescimento em pelo menos uma concentração em todos os isolados avaliados, demonstrando que a combinação de carbapenêmicos ou tetraciclinas com colistina é uma promissora alternativa para a terapia de infecções por *A. baumannii*.

Fam et al. (2017) realizaram um teste de sinergismo para 32 isolados de *A. baumannii* obtidos de pacientes no Egito durante 2014 a 2015. Os resultados mostraram uma redução nos valores da CIM de doripenem quando combinados com sub-CIM de colistina em 27 isolados (84%), mostrando sinergismo entre os dois fármacos, enquanto o antagonismo foi detectado em cinco isolados (16%). Entre os isolados resistentes à colistina, a combinação doripenem-colistina apresentou 91% sinergismo, enquanto em dois isolados (9%) apresentaram ação antagônica (BREMNER et al., 2016; FAM et al., 2017), diferindo dos nossos achados, no aspecto de que não foram observadas nenhuma combinação de antimicrobianos que apresentasse efeito antagônico. Porém quanto ao aspecto de possibilitar visualização da redução nos valores da CIM, estes estudos corroboram com os nossos achados.

Zhu et al. (2018) realizaram testes de combinações de antimicrobianos *in vitro* para 21 isolados de *A. baumannii* provenientes de um hospital na China em 2014. Os isolados com CIM de 16 µg/mL para imipenem (n = 15) apresentaram ação sinérgica para a combinação imipenem + cefoperazone/sulbactam. Em 14 destes isolados com CIM de 16 µg/mL para imipenem e um isolado com CIM de 64 µg/mL foi observada sinergia para a combinação colistina + imipenem. As combinações de imipenem-fosfomicina mostraram sinergia para 12 isolados com CIM de 16 µg/mL. As combinações de (colistina + cefoperazone/sulbactam, colistina + minociclina, colistina + doripenem e colistina + fosfomicina) não apresentaram sinergia. Estes achados indicam a importância de se verificar o perfil de suscetibilidade de isolados bacterianos envolvidos em IRAS para se evitar o aumento da resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento clínico destas infecções (ZHU et al., 2018). O aumento dessa resistência aos antimicrobianos tornou essencial o uso da terapia combinada em detrimento a monoterapia por antimicrobianos, na tentativa de tornar a antibiótico terapia empírica eficaz (BREMNER et al., 2016).

Tendo em vista a problemática de resistência em isolados bacterianos, como *A. baumannii* e necessidade de busca de novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas, devido ao alto nível de falha das terapias usuais, novos estudos propondo estratégias de tratamento devem ser estimulados (BREMMER et al., 2016; FAM et al., 2017; VAARA, 2019). O tratamento empírico com imunoglobulina G intravenosa humanos (IGIV) e antimicrobianos para infecções bacterianas tem revelado resultados promissores; porém, ainda existem dúvidas sobre a atividade dessa associação (SALCEDO et al., 1997; LAUPLAND, 2002; TANAKA et al., 2010; XIONG et al., 2017).

Estudos mostram que quando células bacterianas de diferentes espécies são submetidas a antimicrobianos, estas podem sofrer diversas alterações morfológicas, como: alteração na forma celular (como a formação de esferoplastos ou células ovoides), alongamento celular, perda de material citoplasmático e ruptura da parede celular (DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010; TANAKA et al., 2010, VERAS et al., 2015; CUSHNIE; O'DRISCOLL; LAMB, 2016).

Tanaka et al. (2010) evidenciaram em *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos que *in vitro* a IGIV causou, de forma mais rápida e intensa, efeitos prejudiciais à conservação da morfologia celular, como a formação de esferoplastos, perda de material citoplasmático e coagulação das células bacterianas, em comparação à submissão da mesmo isolado ao meropenem. Contudo, no presente estudo foi possível observar que a combinação da IGIV com meropenem, amicacina e colistina conseguiu provocar em *A. baumannii* alterações e danos a morfologia bacteriana semelhantes às submissões combinadas de antimicrobianos, como: alteração na forma, alongamento celular, rugosidade e ruptura de membrana com perda de material citoplasmático, presença de “bolhas” e “depressão” na membrana. Demonstrando que há possibilidade de utilizar frente a isolados bacterianos, a IGIV em combinação com um antimicrobiano, ao invés da combinação de dois ou mais antimicrobianos.

Observando as alterações morfológicas em isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, Fam et al. (2017) evidenciaram que não há diferenças significativas entre células bacterianas expostas e não expostas à colistina, mostrando estrutura celular uniforme e parede celular intacta, sugerindo que a colistina isolada não consegue alterar morfológicamente as células de *A. baumannii*. Diferentemente dos isolados que mostraram sinergia entre colistina-doripenem, os autores observaram diferentes alterações morfológicas, como arredondamento e alongamento celular, ruptura celular com extravasamento de material citoplasmático após exposição a ½ CIM de doripenem e colistina. Este achado corrobora com nosso estudo, que mesmo utilizando concentrações bem a baixo de ½ CIM de meropenem e colistina, também

podemos evidenciar diferentes e diversas alterações na morfologia da célula bacteriana. Porém, como em nosso estudo, como não foi encontrado nenhum isolado resistente a colistina, ainda assim pudemos observar em isolado de *A. baumannii* com resistência intermediária a presença de diferentes alterações morfológicas, como alongamento e ruptura celular, quando exposto à colistina.

Xiong et al. (2017) demonstraram por microscopia eletrônica que a exposição ao isotipo de IgG (TRL-1068) causou ruptura de biofilme no biofilme de *A. baumannii*. Isso pode evidenciar que o uso de imunoglobulinas G, além de apresentar eficiência agindo em células planctônicas, também age sobre a complexa estrutura do biofilme bacteriano.

5 CONCLUSÃO

Com base nas alterações morfológicas visualizadas neste estudo, devido submissão de isolados MDR de *A. baumannii* a IGIV em combinação com sub-CIM dos antimicrobianos meropenem, amaicacina e colistina, ficou evidenciado que estas combinações causam diferentes e sérios danos a morfologia da célula bacteriana, podendo resultar na destruição e morte celular. Sendo assim, o uso de preparações de IgG, como IGIV associada a antimicrobianos para a terapia de infecções por bactérias resistentes, como isolados MDR de *A. baumannii* é uma alternativa altamente promissora e seu uso pode ser estimulado.

6 AUTORES E CONTRIBUIÇÕES

Lima, FCG; Veras, DL; Oliveira-Júnior, JB; Brayner, FA; Alves, LC participaram das etapas de concepção e planejamento do estudo; Obtenção, análise e interpretação de dados; Análise estatística; Participação intelectual na condução de casos estudados; Revisão crítica da literatura; Elaboração e redação do manuscrito; Revisão crítica do manuscrito; Aprovação da versão final do manuscrito. Cavalcanti, CLB; de Freitas, CF; Silva, EM; Sandes JM: colaborou com as análises e interpretação de dados; Participação intelectual na condução de casos estudados.

7 DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Nenhuma

8 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde-PAPES VI (Process no.407826/2012-2), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

9 APROVAÇÃO ÉTICA

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE) sob parecer favorável de número CAAE: 39858214.2.0000.5208.

10 AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos membros do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ-PE e do laboratório de Microscopia Eletrônica da LIKA / UFPE. Agradecemos também ao IAM-FIOCRUZ pelo programa de desenvolvimento técnico de insumos de saúde (PDTIS) pelo uso de suas instalações. Este trabalho também foi apoiado pela CAPES.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm, acesso em 04 de janeiro de 2019.
- AHMAD I. et al., Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, **Plos One**, p. 1-13, DOI: 10.1371/journal.pone.0210082, 2019.
- ARROYO L. A. et al., The *pmrCAB* Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3743–3751, Aug. doi: 10.1128/AAC.00256-11, 2011.
- BAE S. et al., *In Vitro* Synergistic Activity of Antimicrobial Agents in Combination against Clinical Isolates of Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, doi: 10.1128/AAC.00839-16, 2016
- BREILH D. et al. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 1-17, doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032, 2013.
- BREMMER et al., Correlation of Checkerboard Synergy Testing with Time-Kill analysis and Clinical Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Respiratory Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy November**, v. 60, n. 11, p.6892-6895, doi: 10.1128/AAC.00981-16, 2016.

CAI X. et al. Pharmacodynamics of tigecycline alone and in combination with colistin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacodynamic model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.007>, 2017

CUSHNIE T. P. T. et al., Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action.; **Cellular and Molecular Life Sciences**, [doi.org/10.1007/s00018-016-2302-2](http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2302-2), 2016

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 28th ed. CLSI supplement. M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

DÍAZ-VIRRUSGARA J., GARCIA A., CÁRDENAS G., Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 633–646, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04447, 2010.

DAFOPOULOU K. et al. An update on polymyxin susceptibility testing methods for *Acinetobacter baumannii*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. doi: 10.1080/14787210.2019.1667230, 2019.

DOI Y. et al. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36 (1), p. 85-89, doi: 10.1055/s-0034-1398388, 2015.

EALLES MG. et al. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii*. **Research in Microbiology**, p. 1-7, 2018.

ELHOSSEINY NM; ELHEZAWY NB.; ATTIA AS. Comparative proteomics analyses of *Acinetobacter baumannii* strains ATCC17978 and AB5075 reveal the differential role of type II secretion system secretomes in lung colonization and ciprofloxacin resistance. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 20-27, doi: 10.1016/j.resmic.2018.04.005, 2019.

FAM N. et al., Antimicrobial Efficacy of Doripenem Colistin Combination on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by E-test Agar Dilution and Ultrastructural Methods, **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 1-7, DOI: 10.12816/0046266, 2017.

FARAG, N. et al. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 9, p. 1149-60, set. 2013.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. **Healthcare Epidemiology**, v. 42, p. 692-699, 2006.

FUJIKURA Y. et al., Blood stream infections caused by *Acinetobacter baumannii* group in Japan e Epidemiological and clinical investigation, **Journal Infection Chemotherapy**, p. 1-6, doi: 10.1016/j.jiac.2016.02.006 ,2016.

JAIN et al., Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates causing lower respiratory infections among ICU patients, **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p.75–81, <https://doi.org/10.1086/500202>, 2019.

LAUPLAND, K. B. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the prophylaxis and treatment of infection in critically ill adults. **The Canadian journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 100-6, mar., DOI:10.1155/2002/127953, 2002.

LEITE G. C., et al., Effect of Antibiotics Combination and Comparison of Methods for Detection of Synergism in Multiresistant Gram-Negative Bacteria. **Journal Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 2, DOI: 10.4172/2332-0877.1000207, 2015.

MAIFIAH M. H. M., Untargeted metabolomics analysis reveals key pathway responsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against *Acinetobacter baumannii*, **Scientific Reports**, v. 7, n. 45527, doi: 10.1038/srep45527, 2017.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 46, p. 1254-1263, doi: 10.1086/529198, 2008.

MARTINS AL.; BARTH AL., *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública, **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 56-62, DOI: 10.15448/1980-6108.2013.1.12563, 2013.

MCCONNELL M. J.; ACTIS L; PACHÓN J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **Federation of European Microbiological Societies**, v.37, p. 130–155, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344, 2013.

OLIVEIRA J. F. P., CIPULLO J. P., BURDMANN E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal Of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n.4, p. 444-452, <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382006000400015>, 2006.

PILLAI S. K.; MOELLERING R. C.; ELIOPOULOS G. M., Antimicrobial combinations. In: Lorian, V., ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia: p.365-440, 2005.

RODRIGUEZ CA. et al. Discrepancies in susceptibility testing to colistin in *Acinetobacter baumannii* : The influence of slow growth and heteroresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1-5, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.010, 2019.

RUSSO, T. A. et al., The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3993-4000, doi: 10.1128/IAI.00366-10, 2010.

SALCEDO, J. et al. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. **Gut**, v. 41, n. 3, p. 366-70, doi: 10.1136/gut.41.3.366, 1997.

SCAVUZZI AML et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 1370–1377, 2016.

SHAN K. et al., Evaluation of Resistance by Clinically Pathogenic Bacteria to Antimicrobials and Common Disinfectants in Beijing, China, **Journal nippon Med Sch**, v. 85, https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2018_85-49, 2018

TAITT C. R. et al., Antimicrobial Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates Taken from Military Treatment Facilities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.2, p.767-781, doi: 10.1128/AAC.01897-13, 2014.

TANAKA J. et al. Complement-mediated bacteriolysis after binding of specific antibodies to drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: morphological changes observed by using a field emission scanning electron microscope. **Journal Infection Chemother**, v. 16, p. 383-387, doi: 10.1007/s10156-010-0074-4, 2010.

VAARA M., Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. **Molecules**, v. 24, n. 249, doi: 10.3390/molecules24020249, 2019.

VERAS DL. et al., Ultrastructural Changes in Clinical and Microbiota Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Carriers of Genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, or blaKPC When Subject to β -Lactam Antibiotics, **Scientific World Journal**, v. 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/572128>, 2015.

VIANA G. F. et al. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital, **Letters in Applied Microbiology**, doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03109.x, 2011

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, London, GB v. 8, n. 1, p. 27-39, doi: 10.2217/fmb.12.130, 2013.

WHO. World Health Organization. The detection and reporting of colistin resistance. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/glass/en/>>, acesso em 17 de janeiro de 2019.

XIONG YQ et al., A Human Biofilm-Disrupting Monoclonal Antibody Potentiates Antibiotic Efficacy in Rodent Models of both *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter Baumannii* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, I. 10, doi: 10.1128/AAC.00904-17, 2017.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: the Molecular Epidemic Features of an Emerging Problem in Health Care Facilities. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 5, p. 335-341, DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.240>, 2009.

YE S. et al., In vitro evaluation of the biological activities of IgG in seven Chinese intravenous immunoglobulin preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 151, p. 317–323, doi: 10.1016/j.jpba.2018.01.021, 2018.

ZHU W. et al., In vitro evaluation of antimicrobial combinations against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of different. **Journal of Infection and Public Health**, v.11, p. 856–860, doi: 10.1016/j.jiph.2018.07.006, 2018.

5.2 ARTIGO 2 - AÇÃO *IN VITRO* DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA HUMANA EM COMBINAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS E SORO HUMANO FRENTE ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*.

RESUMO

A alta incidência de isolados multidroga-resistentes (MDR) de *Acinetobacter baumannii* tem tornado desafiador o tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana, isto devido à diminuição das opções terapêuticas disponíveis, fazendo-se necessário o uso de combinações de diferentes antimicrobianos para o tratamento dessas infecções, como meropenem, amicacina e colistina. E como resposta as infecções, no corpo humano ocorre a ativação do sistema imunológico adaptativo, sendo produzidos anticorpos contra esses patógenos, principalmente as imunoglobulinas G (IgG) desempenhando mecanismos efetores como a neutralização, opsonização, fagocitose e a ativação do sistema complemento. Nas últimas décadas, alguns estudos vem mostrando o importante papel das IgG no combate de infecções, o tratamento empírico com preparações IgG e antimicrobianos para infecções bacterianas tem revelado resultados promissores, onde a ação direta da IgG, ao invés da reposição do equilíbrio do sistema imunológico, tem sido o objetivo da terapia. Considerando a grave problemática causada pelo aumento da multidroga-resistência em isolados de *A. baumannii* e a busca constante por alternativas terapêuticas para sanar essas infecções, este estudo visa verificar a taxa de fagocitose por monócitos humanos infectados por *A. baumannii in vitro*, assim como analisar as possíveis alterações morfológicas induzidas pela IGIV com soro humano em associação a antimicrobianos. Foi determinada a taxa de fagocitose e a capacidade de ligação da IGIV a célula bacteriana para 2 isolados da espécie *A. baumannii* submetidos à 4mg/mL de IGIV humana isoladamente e em combinação com diferentes sub-CIM sinérgicas dos antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina. Posteriormente, estes isolados foram novamente submetidos e juntamente com soro humano foram processados para microscopia eletrônica de varredura. Não houve diferença estatisticamente significativa para as taxas de fagocitose nos isolados testados. Os isolados bacterianos apresentaram alterações na morfologia celular quando submetidos à IGIV/Soro humano isoladamente e em combinação com antimicrobianos como: alteração na forma, enrugamento, depressão da membrana e principalmente ruptura celular com extravasamento de material citoplasmático. Os isolados apresentaram visualmente diferença na ligação da IGIV à célula bacteriana, com maior fluorescência no isolado mais sensível aos antimicrobianos meropenem, amicacina e

colistina, ou seja, maior ligação da IGIV com a célula bacteriana. Entre os tratamentos não foram observadas diferenças na ligação da IGIV a célula bacteriana. A ação combinada da IGIV com meropenem, amicacina e colistina frente isolados MDR de *A. baumannii* causa diversos danos à célula bacteriana. E quando associados ao soro humano, pode ser verificada uma grande destruição de células. Estes resultados podem sugerir a análise do uso de preparações de IgG para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR.

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista, causador de diferentes infecções como pneumonia, endocardite e meningite, sendo responsável pela maioria das Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) (FAM et al., 2017; MAIFIAH et al., 2017; AHMAD et al., 2019). A alta incidência de isolados multidroga-resistentes (MDR) de *A. baumannii* tem tornado desafiador o tratamento, devido à diminuição das opções terapêuticas disponíveis (DOI; MURRAY; PELEG, 2016, ELHOSSEINY; ELHEZAWY; ATTIA, 2018), aumentando as taxas de morbidade e mortalidade, além dos custos para as instituições de saúde devido a estas Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS).

Não existe um comportamento clínico padrão para o tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* MDR, fazendo-se necessário o uso de diferentes classes de antimicrobianos para o tratamento destas infecções (ELHOSSEINY; ELHEZAWY; ATTIA, 2018). A amicacina, um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, apresenta um amplo espectro de ação contra bacilos Gram-negativos, incluindo *A. baumannii* (ANVISA, 2019). Assim como o meropenem, um carbapenêmico, comumente considerado mais seguro e eficiente, assumindo um grande papel no tratamento de graves infecções por bactérias MDR. Porém, o aumento da resistência bacteriana tem reduzido consideravelmente as opções terapêuticas atuais (BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017). E como consequência desta redução, o uso das polimixinas, como a colistina foi retomado, tornando-se fármacos essenciais na terapêutica de infecções por *A. baumannii* MDR (MAIFIAH et al., 2017; OMS, 2018; VAARA, 2019).

O corpo humano utiliza-se da ação tanto da imunidade inata quanto à adaptativa contra microrganismos patogênicos (CARVALHO et al., 1998; MACHADO et al., 2004). A resposta adaptativa, por meio da imunidade humoral é o principal mecanismo envolvido na eliminação das bactérias extracelulares. Os anticorpos, produzidos contra esses patógenos, desempenham mecanismos efetores importantes como a neutralização, opsonização seguido de fagocitose e

a ativação do complemento pela via clássica. Os anticorpos, imunoglobulinas G e A (IgG, IgA) impedirão a ligação dos mesmos a receptores presentes na superfície das células alvos, neutralizando, assim, a ação desses microorganismos (MACHADO et al., 2004; COELHO-CASTELO et al., 2009).

Em vista do importante papel das IgG no combate de infecções, o tratamento empírico com preparações IgG e antimicrobianos para graves infecções bacterianas tem revelado resultados promissores, onde a ação direta da imunoglobulina, ao invés da reposição do equilíbrio do sistema imunológico, tem sido o objetivo da terapia (TANAKA et al., 2010; et al., 2016; YE et al., 2018). Contudo, há pouco entendimento a respeito da associação da IgG presente em preparações de Imunoglobulina G Intravenosa humana (IGIV) *in vitro* associada a antimicrobianos contra microorganismos de importância clínica.

Tanaka et al. (2010) realizaram estudo *in vitro* utilizando *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenênicos, demonstrando que a Imunoglobulina G Intravenosa humana (IGIV) causa alterações morfológicas prejudiciais a célula bacteriana de forma mais rápida e intensa, quando comparados ao carbapenêmico meropenem. Enquanto que Farag et al. (2013) demonstraram que a IGIV aumentou a fagocitose de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) por neutrófilos, dependente da dose de IGIV.

Em contrapartida, ao comparar macrófagos infectados por cepas de MRSA e MSSA (*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*), Morais et al. (2013) demonstraram que não houve diferença significativa quanto às taxas de adesão celular e fagocitose de células bacterianas. Observando os estudos de Morais et al. (2013) e Farag et al. (2013) podemos evidenciar que a IGIV humana promoveu aumento da fagocitose por células de defesa humana.

Tendo em vista, a grave problemática causada pelo aumento da multidroga-resistência em isolados de *A. baumannii* e a busca constante por alternativas terapêuticas para sanar as infecções causadas por este patógeno, a realização de mais estudos quanto à atividade *in vitro* de preparações IGIV humana frente isolados obtidos de IRAS de *A. baumannii*. Portanto, este estudo visa verificar a taxa de fagocitose por monócitos humanos e analisar as possíveis alterações ultraestruturais de *A. baumannii* induzidas pela IGIV com soro humano em associação com antimicrobianos utilizados na prática clínica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANTIMICROBIANOS E IGIV

Os antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina foram adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich. A IGIV policlonal humana comercialmente disponível como Endobulin Kiovig Imunoglobulina Intravenosa pela Baxter International Inc. Brasil, fornecido como solução injetável a 10%.

2.2 ISOLADOS BACTERIANOS

Foram utilizados 2 isolados bacterianos de *A. baumannii* provenientes de hospital público da região metropolitana do Recife/PE, nos anos de 2013 e 2014. Foram identificados pelo sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux) e armazenados em solução a 20% de glicerol a temperatura -80°C até o uso.

Estes isolados foram triados quanto ao perfil de resistência genética e fenotípica, em outro estudo. Foram selecionados isolados clínicos MDR de *A. baumannii* com base no perfil de sensibilidade a meropenem, amicacina e colistina associado à presença de alterações morfológicas quando submetidos aos antimicrobianos. O isolado 808 apresentou resistência ao meropenem e resistência intermediária aos outros antimicrobianos como também apresentou poucas alterações morfológicas. Já o isolado 119 apresentou sensibilidade aos três antimicrobianos e a presença de mais alterações morfológicas quando ambos foram submetidos à IGIV isoladamente ou associada aos antimicrobianos (dados não publicados).

2.3 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

Os dois isolados foram reativados em ágar BHI, em seguida colocados em caldo BHI e incubados em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 18 horas. Posteriormente, em microplacas contendo caldo Muller Hinton, os isolados foram submetidos a 4mg/ml de IGIV isoladamente ou em combinação com cada antimicrobiano (meropenem, amicacina e colistina) separadamente ou associados (meropenem/amicacina e meropenem/colistina) nas concentrações sub-sinérgicas apresentadas na TABELA 1. Para todos os grupos testes foram submetidos controles somente com IGIV ou antimicrobianos isoladamente, assim como controles sem a presença de IGIV ou antimicrobianos. Por fim, foi adicionado 2µL de suspensão bacteriana ajustada a escala 0.5 de MacFarland, correspondente a 10⁸ UFC/mL. Posteriormente, as microplacas foram incubadas por 8 horas em estufa bacteriológica para

realização da taxa de fagocitose, microscopia eletrônica de varredura com IGIV + soro humano e imunofluorescência (apenas os grupos com IGIV).

TABELA 1: Concentração Inibitória Mínima dos isolados de *Acinetobacter baumannii* e concentrações sub-sinérgicas para os antimicrobianos

ISOLADOS	Concentrações dos antimicrobianos (µg/mL)								
	MEROPENEM			COLISTINA			AMICACINA		
	CIM	Int.	Sub-CIM	CIM	Int.	Sub-CIM	CIM	Int.	Sub-CIM
119	0,5	S	0,031	1	S	0,062	1	S	0,062
808	64	R	4	4	I	0,25	32	S	2

CIM – Concentração Inibitória Mínima; S – Sensível; I – Intermediária; R - Resistente. Int. –Interpretação da CIM segundo o CLSI, 2018.

2.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

A obtenção do PBMC foi realizada segundo protocolo de Lorena et al. (2008). 50 mL de sangue coletados em tubos heparinizados foi misturado na proporção de 1:1 a uma solução salina com fosfato (PBS) pH 7.2. Em seguida, o sangue diluído foi distribuído em tubos falcon contendo Ficoll-Hipaque (GE HEALTHCARE) e centrifugado por 30 min a 900g. Após centrifugação, as células do anel contendo o PBMC foram retiradas, lavadas (1 vez PBS + 1 vez meio RPMI incompleto) e centrifugadas a 900 g por 2 vezes. Após descarte do sobrenadante da última lavagem, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo, diluídas em azul de Trypan para a realização da contagem em Câmara de Neubauer.

2.5 TAXA DE FAGOCITOSE

Em placas de 24 poços contendo em cada poço lamínulas de vidro redondas de 13 mm, 1×10^6 de células de PBMC foram distribuídas e incubadas durante duas horas em atmosfera úmida a 5% CO_2 , para adesão das células a superfície das lamínulas. Posteriormente as suspensões bacterianas descritas no subitem 2.3 foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI, e ajustadas à concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram utilizadas para infecção das células do PBMC em cada poço. A placa resultante foi incubada em atmosfera úmida a 5% de CO_2 durante 1 hora. Posteriormente, a incubação, as lamínulas foram retiradas dos poços coradas e montadas em lâminas para microscopia óptica. Os resultados foram expressos em porcentagem de células fagocíticas em uma contagem total de 100 células por lamínula.

2.6 SORO HUMANO

O soro foi obtido a partir da coleta de amostra sanguínea. O sangue foi centrifugado por 5min a 3000 rpm para a separação dos componentes sanguíneos. Em seguida, o soro humano foi utilizado para a etapa de microscopia eletrônica de varredura juntamente com os dois isolados bacterianos.

2.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Dois isolados de *A. baumannii* foram submetidos às concentrações de antimicrobianos apresentadas na Tabela 1 (subitem 2.3), juntamente com 4mg/mL IGIV + 40% de soro humano. Em todos os processamentos foram incluídos um controle de cada isolado sem a presença dos antimicrobianos ou IGIV + soro humano. Após incubação a 37 °C por oito horas, as células foram centrifugadas, lavadas em tampão fosfato (0.1M, pH 7.2) e fixadas em Karnovsky (tampão fosfato, glutaraldeído 2.5% e formaldeído 4%) para posterior processamento de rotina específica (VERAS et al., 2015). As amostras foram visualizadas em microscópios eletrônicos de varredura JOEL JSM-5600 LV.

2.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para verificar a ligação da IGIV com a célula bacteriana de *A. baumannii*, as suspensões bacterianas descritas na Tabela 1 (subitem 2.3) foram submetidas a IGIV isoladamente e em combinação com antimicrobianos (meropenem, amicacina e colistina). Após incubação a 37°C por 8 horas, os isolados (subitem 2.1) foram centrifugados e ressuspendidos em tampão fosfato (PBS) 1 M, pH 7.2, seguido por ajuste à concentração de 1.5×10^8 UFC/mL. Foram utilizadas como controles, as células submetidas somente a IGIV e células não submetidas. Foram distribuídos 15 µL da suspensão bacteriana em lâminas específicas e postas para secar durante duas horas em estufa a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com anti-IgG conjugada com FITC por 30 minutos. Depois foram lavadas, secas, montadas com prolong Diamond (ThermoFisher) para visualização em microscópio AXIO (Zeiss).

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 para a análise de variância One way e Two Way (ANOVA) para a comparação das médias entre os diferentes grupos experimentais na Taxa de Fagocitose. One way Anova comparando todos os tratamentos em cada isolado de *Acinetobacter baumannii*. Two way Anova comparando cada tratamento nos dois isolados de

Acinetobacter baumannii. Em seguida foram realizados os testes de significância de Turkey's para comparar a taxa de fagocitose produzida por monócitos desafiados com bactérias submetidas em relação ao controle (sem submissão), e em entre os grupos testes. Os resultados foram expressos em média. A significância foi definida por $p < 0.05$.

2.10 Considerações Éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE) sob parecer favorável de número CAAE: 39858214.2.0000.5208. O soro humano foi obtido a partir da coleta de amostra sanguínea de um doador voluntário, que aceitou participar do presente estudo por meio de assinatura do Termo de consentimento livre e Esclarecido.

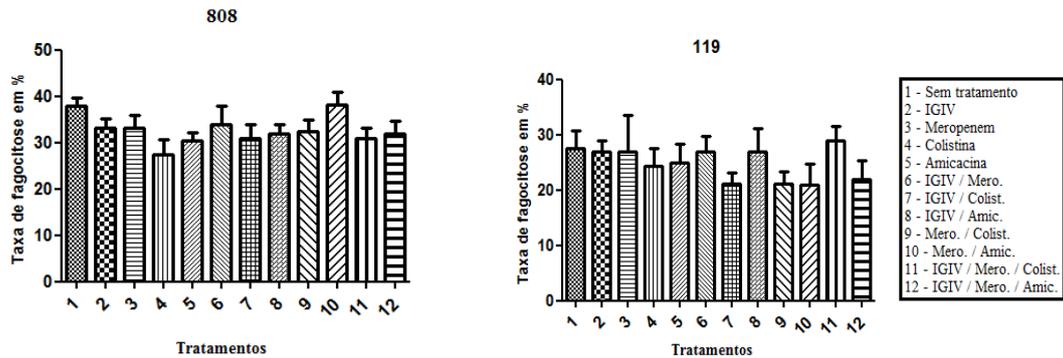
2.11 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde-PAPES VI (Process no.407826/2012-2), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3 RESULTADOS

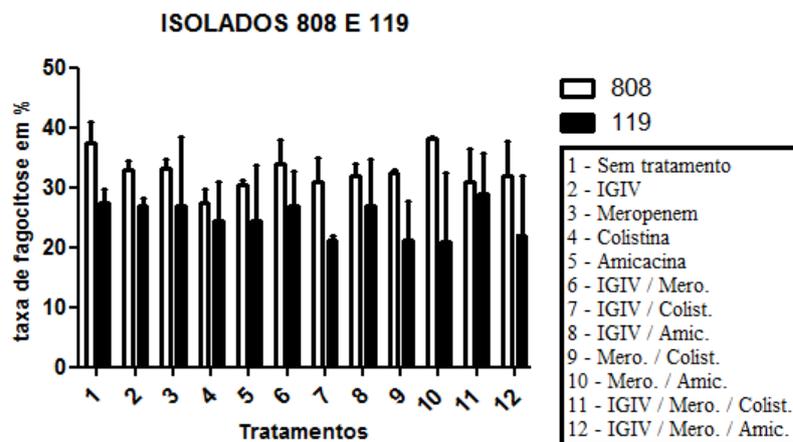
3.1 TAXA DE FAGOCITOSE

Quando as porcentagens das taxas fagocitose por monócitos humanos infectados pelos isolados 808 e 119 foram analisadas separadamente, a submissão prévia dos isolados bacterianos a IGIV e antimicrobianos isoladamente, em diferentes combinações não apresentaram diferença estatisticamente significativa (FIGURA 1). Ao analisar as taxas de fagocitoses nos isolados conjuntamente, comparando cada teste de submissão nos dois isolados, também não foi observada diferença estatisticamente significativa para as taxas (FIGURA 2.)

FIGURA 1- Taxa de fagocitose com os isolados de *Acinetobacter baumannii*

Fonte: O autor, 2019

Análise da taxa de fagocitose utilizando One way ANOVA com testes de significância de Turkey's comparando todos os tratamentos em cada isolado de *Acinetobacter baumannii*.

FIGURA 2 - Avaliação do tratamento na Taxa de fagocitose com os isolados de *Acinetobacter baumannii*

Fonte: O autor, 2019

Análise da taxa de fagocitose utilizando Two way ANOVA com testes de significância de Turkey's comparando cada tratamento nos dois isolados de *Acinetobacter baumannii*.

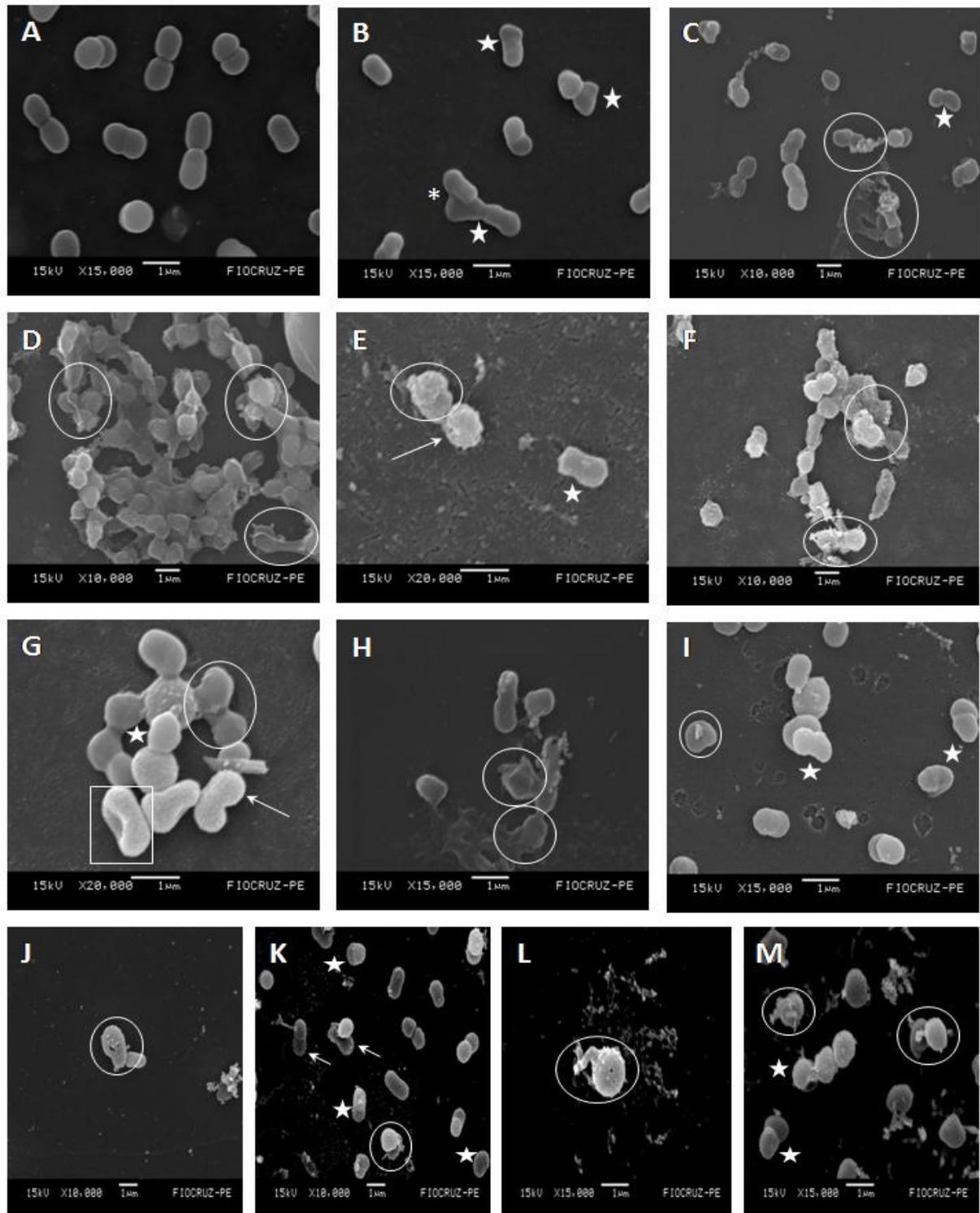
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Isolado 808

Comparando com controle não submetido à IGIV, antimicrobianos ou soro humano (FIGURA 3-A), foi verificado que as células submetidas somente ao soro humano sofreram alterações na sua forma, perdendo a característica morfológica de cocobacilo inerente à espécie *A. baumannii*, sendo este o único tratamento a causar somente uma única alteração. Todos os outros grupos avaliados, incluindo a submissão somente ao IGIV/soro, causaram

ruptura nas células bacterianas, com perda de material citoplasmático (FIGURAS 3C-M). Quando submetidos à IGIV e soro humano, IGIV/amicacina/soro humano e IGIV/meropenem/amicacina/soro humano, além da ruptura celular exibiram alteração da forma celular (FIGURAS 3C, I e M). Já as células submetidas à colistina/soro humano e meropenem/amicacina/soro humano, além de ruptura celular e alteração na forma apresentaram enrugamento na superfície celular (FIGURAS 3E e K). No entanto, a submissão das células a IGIV/meropenem/soro humano também causou depressão na membrana celular (FIGURA 3G).

FIGURA 3 - (A-L) Eletromicrografias de *Acinetobacter baumannii* do isolado 808



Fonte: O autor, 2019

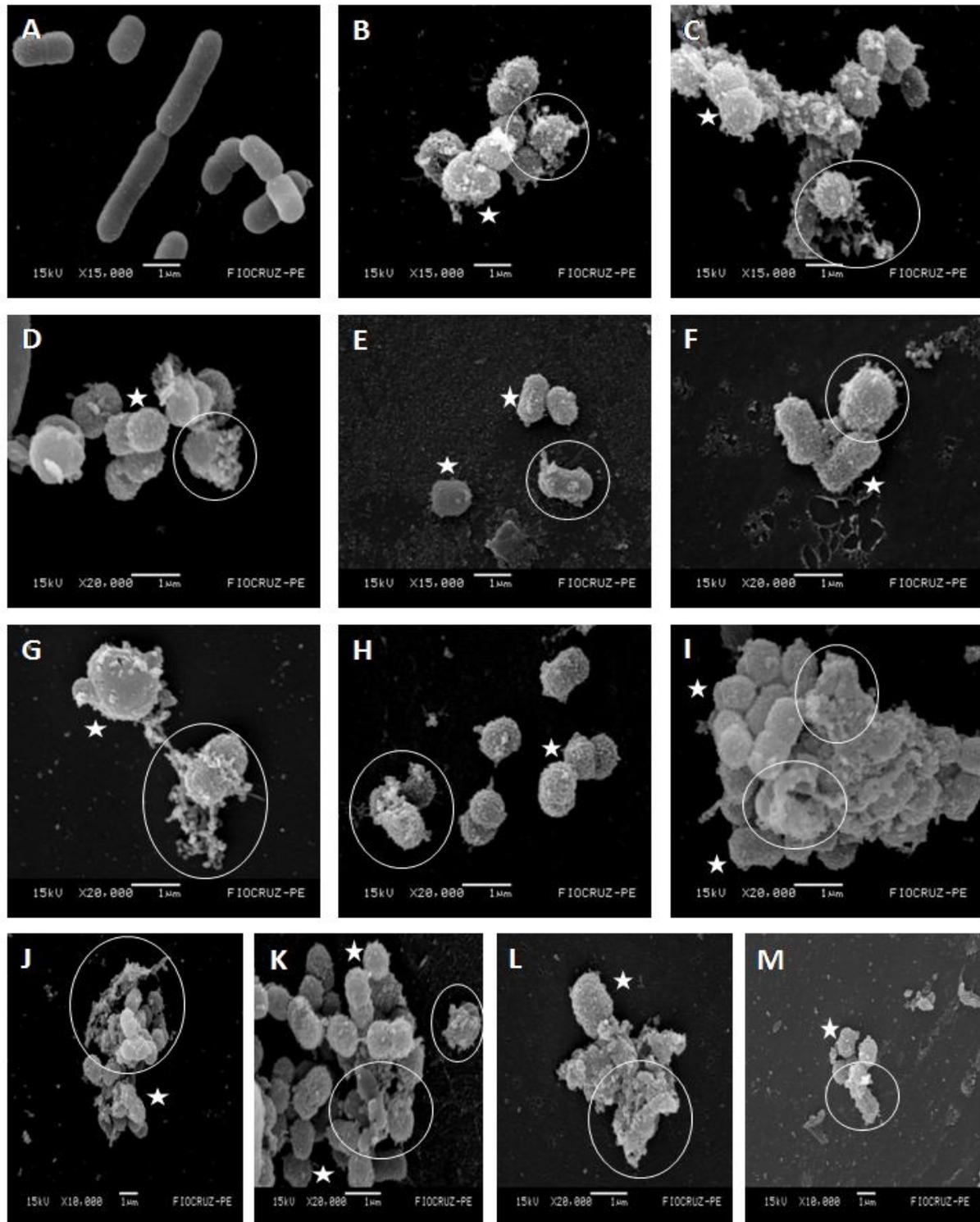
(A) Células não tratadas com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; (B) Células submetidas a 40% de soro humano, apresentando alteração na forma (estrela) e divisão celular incompleta (asterisco); (C) Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV e 40% de soro humano, apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (círculo); (D) Células submetidas a 4 µg/mL de meropenem e 40% de soro humano apresentando ruptura celular (círculo); (E) Células submetidas a 0.25µg/mL colistina e 40% de soro humano apresentando enrugamento (seta) na superfície, alteração na forma (estrela) e ruptura celular (círculo); (F) Células submetidas a 2 µg/µL amicacina e 40% de soro humano apresentando

ruptura celular (circulo); **(G)** Células submetidas a IGIV/Meropenem e 40% de soro humano apresentando enrugamento (seta) na superfície, alteração na forma (estrela), depressão na superfície da membrana (quadrado) e ruptura celular (circulo); **(H)** células submetidas a IGIV/Colistina e 40% de soro humano apresentando ruptura celular (circulo); **(I)** Células submetidas a IGIV/amicacina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); **(J)** Células submetidas a meropenem, colistina e 40% de soro humano apresentando ruptura celular (circulo); **(K)** Células submetidas a meropenem e amicacina e 40% de soro humano apresentando enrugamento (seta) na superfície, alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); **(L)** células submetidas a IGIV, meropenem, colistina e 40% de soro humano apresentando ruptura celular (circulo); **(M)** células submetidas a IGIV, meropenem, amicacina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo).

Isolado 119

Este isolado apresentou morfologia preservada quando não submetido (FIGURA 4A). Porém, quando submetido ao soro humano, ao soro humano/IGIV ou cada antimicrobiano: meropenem, amicacina ou colistina isoladamente ou em combinações variadas, apresentou alterações na sua forma original e ruptura celular, com nítida visualização de perda de material citoplasmático (FIGURAS 4B-M).

FIGURA 4 - (A-L) Eletromicrografias de *Acinetobacter baumannii* do isolado 119



Fonte: O autor, 2019

(A) Células não tratadas com tamanhos e formas preservadas, com ocorrência da formação de septos e divisão celular normal; (B) Células submetidas a 40% de soro humano, apresentando alteração na forma (estrela) e divisão celular incompleta (asterisco); (C) Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (D) Células submetidas a 4 μg/mL de meropenem e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (E) Células submetidas a 0.25 μg/mL colistina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (F) Células submetidas a 2 μg/μL amicacina e 40% de soro humano apresentando

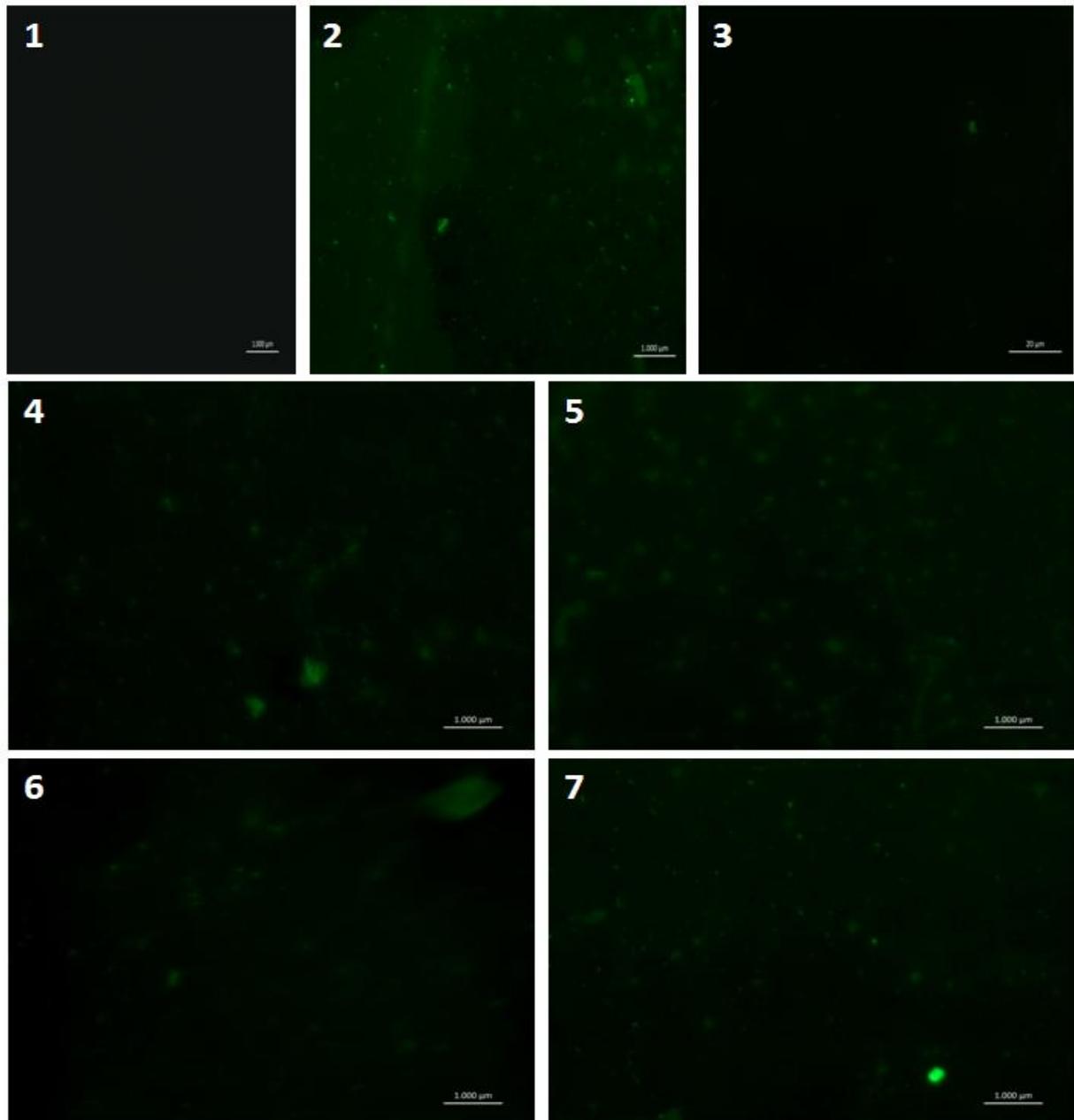
alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (G) Células submetidas a IGIV/Meropenem e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (H) células submetidas a IGIV/Colistina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (I) Células submetidas a IGIV/amicacina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (J) Células submetidas a meropenem, colistina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (K) Células submetidas a meropenem e amicacina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (L) células submetidas a IGIV, meropenem, colistina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo); (M) células submetidas a IGIV, meropenem, amicacina e 40% de soro humano apresentando alteração na forma (estrela) e ruptura celular (circulo).

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Ao observar as micrografias dos isolados 808 e 119 de *A. baumannii* conjuntamente, o isolado 808 apresentou visivelmente menor fluorescência que o isolado mais sensível, 119, ou seja, menor ligação da IGIV com a célula bacteriana (FIGURAS 5-6). Já ao verificar separadamente os dois isolados bacterianos, para o isolado 808, as diferentes submissões de IGIV combinadas com cada um dos antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina, não apresentaram diferença visível da fluorescência nas micrografias analisadas (FIGURAS 5.1-5.7).

Quando observada a fluorescência no isolado 119, foi visualizado que as diferentes submissões de IGIV isoladamente e em combinação com os antimicrobianos meropenem, amicacina e colistina, apresentaram-se visivelmente semelhantes quanto à fluorescência nas micrografias, demonstrando que não houve diferença na ligação da IGIV a célula bacteriana devido a submissão aos antimicrobianos (FIGURAS 6.1-6.7).

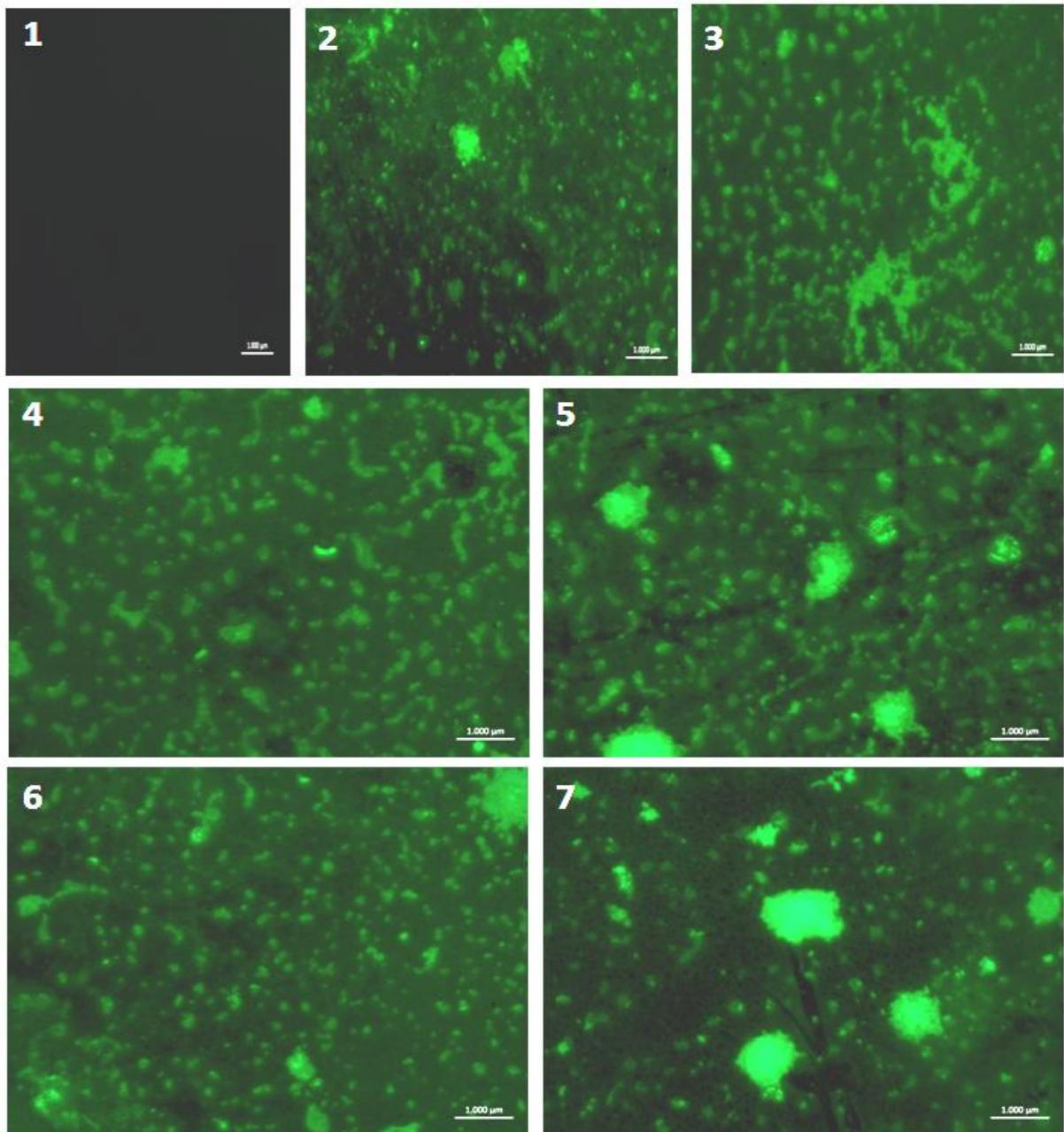
FIGURA 5 - (1-7) Micrografias de imunofluorescência do isolado 808 de *Acinetobacter baumannii* com anti-IgG conjugada com FITC



Fonte: O autor, 2019

1- Células bacterianas não tratadas com IGIV ou antimicrobianos não apresentando fluorescência; 2- Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV; 3 - Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV e 4 μg/ml de meropenem; 4 - Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV e 0,25 μg/ml de Colistina; 5 - Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV e 2 μg/ml de Amicacina. 6 - Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV, 4 μg/ml de meropenem e 0,25 μg/ml de Colistina; 7 - Células submetidas a 4 mg/μL de IGIV, 4 μg/ml de meropenem e 2 μg/ml de Amicacina. As micrografias de 2-7 mostram expressão da fluorescência do marcador anti-IgG conjugada com FITC.

FIGURA 6 (1-7) - Micrografias de imunoflorescência do isolado 119 de *Acinetobacter baumannii* com anti-IgG conjugada com FITC



Fonte: O autor, 2019

1- Células bacterianas não tratadas com IGIV ou antimicrobianos não apresentando fluorescência; 2- Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV; 3 - Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV e 0,031 µg/mL de meropenem; 4 - Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV e 0,062 µg/mL de Colistina; 5 - Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV e 0,062 µg/mL de Amicacina. 6 - Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV, 0,031 µg/mL de meropenem e 0,062 µg/mL de Colistina; 7 - Células submetidas a 4 mg/µL de IGIV, 0,031 µg/mL de meropenem e 0,062 µg/mL de Amicacina. As micrografias de 2-7 mostram expressão da fluorescência do marcador anti-IgG conjugada com FITC.

4 DISCUSSÃO

O sistema imunológico é o principal responsável pela defesa do organismo humano contra microrganismos infectantes, tanto as barreiras naturais como a imunidade inata e a adaptativa participam deste mecanismo de defesa (CARVALHO et al., 1998; MACHADO et al, 2004). As bactérias apresentam estruturas capazes de ativar diretamente a via alternativa do sistema complemento, sendo fagocitadas por macrófagos e neutrófilos através da ativação de receptores específicos, num processo chamado de opsonização. A continuação da cascata do sistema complemento, na superfície do patógeno, resulta na formação do complexo de ataque à membrana e na sua lise direta (MACHADO et al, 2004; COELHO-CASTELO et al, 2009).

O tratamento empírico com imunoglobulina G intravenosa humana (IGIV) associada aos antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas vem sendo utilizado e tem revelado resultados promissores, como a redução da incidência de infecção após tratamento profilático com a IGIV, e por possuir uma ampla atividade contra diferentes espécies bacterianas e seus superantígenos, assim como comprovada redução no tempo de internação de pacientes em UTIs e enfermarias de hospitais, demonstrando que o uso de IGIV pode ser uma forte alternativa como adjuvante na terapia de infecções resistentes (SALCEDO et al., 1997; NORRBY-TEGLUND et al., 1998; CAMPBELL, GEORGIU, KEMP, 1999; LAUPLAND, 2002; TANAKA et al., 2010; OLIVARES et al., 2017; TARNUTZER et al., 2018).

Farag et al. (2013), investigando o efeito *in vitro* da capacidade de neutrófilos humanos em fagocitar isolados de MRSA submetidos previamente a IGIV, demonstraram que, diferindo dos nossos achados que não encontramos diferença estatisticamente significativa na taxa de fagocitose, a IGIV aumentou significativamente a morte por fagocitose de MRSA por neutrófilos em todas as concentrações de IgG testadas (0.1-5 mg/mL) por 30-80% dos valores do controle. Contudo, não foram realizados testes para verificar a taxa de fagocitose em isolados bacterianos quando submetidos à IGIV em associação com antimicrobianos.

Em outros estudos, verificando a atividade opsonizadora de células fagocíticas contra diferentes espécies bacterianas, como *Streptococcus sp.*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus sp.*, *A. baumannii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* submetidas a diferentes preparações de IGIV, foi demonstrado que ocorreu aumento significativo da opsonização dose-dependente. Porém, quando utilizado albumina ou a preparação de IGIV contendo pepsina não ocorreu aumento da opsonização (BASMA et al.,

1998; MIKOLAJCZYK et al., 2004; ONO et al. 2004). Sugerindo que o excipiente da preparação da IGIV pode influenciar na taxa de fagocitose. O que pode ter ocorrido em nosso estudo, no qual não houve variação na taxa de fagocitose, contudo também não foi avaliada se ocorreu influência do excipiente da preparação de IVIG.

Segundo Díaz-Visurraga; Cárdenas; García (2010) é importante realizar estudos utilizando diferentes métodos, quando se trata do uso de preparações de IgG. Como realizado no presente estudo, no qual foi verificada a ação direta da IGIV sobre a célula bacteriana e seu uso combinado com antimicrobianos. Sendo verificado o efeito que a IGIV causa na morfologia da célula de *A. baumannii*.

Outros estudos demonstraram que não houve diferenças estatísticas na taxa de fagocitose em macrófagos de ratos expostos a MRSA e MSSA, evidenciando assim, como em nosso estudo, que mesmo diferindo a espécie bacteriana e o padrão de um determinado antimicrobiano, não altera a fagocitose por células do sistema imunológico (MORAIS et al. 2013; MORAIS et al. 2014).

Estudos mostram que em concentrações sub-inibitórias, os antimicrobianos isoladamente ou em combinação podem causar diferentes alterações morfológicas nas células bacterianas, como mudança no formato celular, alongamento celular, ruptura celular com extravasamento de material citoplasmático, bolhas, depressões na membrana e parede celular, entre outras, demonstrando que diferentes concentrações sub-inibitórias podem causar sérios danos à integridade da célula bacteriana, possibilitando a ação de outras substâncias, como preparações de IGIV (CUSHNIE; O'DRISCOLL; LAMB, 2010; DÍAZ-VISURRAGA; CÁRDENAS; GARCÍA, 2010; VERAS et al., 2015; SALLAM et al., 2016; SCANDORIEIRO et al., 2016; SCAVUZZI et al., 2016; XIONG et al., 2017; SHI et al., 2017).

As alterações morfológicas visualizadas no presente estudo foram principalmente alterações na forma da célula bacteriana e ruptura celular com extravasamento de material citoplasmático, não possibilitando evidenciar outras alterações devido à vasta destruição das células. Sugerindo que devido à presença da IgG juntamente com o soro humano pode ter ativado o complexo de ataque à membrana causando a lise de muitas células (MACHADO et al, 2004).

Fam et al. (2017) demonstraram que em isolados de *A. baumannii* quando submetidos a ½ CIM de doripenem e colistina em concentrações sinérgicas, são observadas alterações morfológicas na célula bacteriana como, rompimento e destruição da parede celular com liberação de material intracelular. Contudo, não foram observadas alterações morfológicas

nos isolados resistentes à colistina quando submetida à polimixina isoladamente. Este último resultado difere do presente estudo, pois no isolado com resistência intermediária à colistina foram visualizadas alterações morfológicas quando submetido a concentrações sub-sinérgicas de colistina isoladamente e em combinações com os antimicrobianos meropenem e amicacina.

Tanaka et al. (2010) ao analisar uma *P. aeruginosa* resistente ao meropenem e demonstraram que a submissão da cepa à IGIV com soro humano causou diminuição de células bacterianas e presença de alterações morfológicas como a coagulação das células bacterianas em ambas as fases de crescimento, lise celular, formação de células redondas e com protuberâncias, em comparação com meropenem, contudo, em menor tempo. Adicionalmente, quando a cepa de *P. aeruginosa* foi incubada em soro depletado de IgG, a lise bacteriana e a deposição deste anticorpo não foram observadas. Evidenciando a vital importância da presença do anticorpo na destruição das células bacterianas, corroborando mais uma vez com nossos achados em isolados *A. baumannii*. Já Xiong et al. (2017) verificaram o TRL-1068, um isotipo de IgG, causou rupturas na superfície do biofilme formado por *A. baumannii*. Estes estudos demonstraram que as IgG podem provocar alterações morfológicas em células bacterianas livres no meio como também quando estão associadas em um biofilme.

O presente trabalho evidenciou a ligação da IgG a superfície das células bacterianas de *A. baumannii* quando estas foram submetidas à IGIV isoladamente e em combinações com antimicrobianos. Anteriormente havia sido relatada a capacidade de ligação da IgG presentes em preparações de IGIV à componentes de células bacterianas de outras espécies como à proteínas de *Escherichia coli* e a ligação e neutralização da toxina LukAB em isolados de *S. aureus* (WOOD et al., 2017; YE et al 2018).

Como exposto anteriormente, o uso de preparações de IgG, como as IGIV para o tratamento empírico de pacientes já é bem difundido, porém quanto ao uso *in vitro* ainda restavam dúvidas (FARAG et al., 2013; LEE; KIM; KIM, 2016, NEGM et al., 2017; ZHANG et al., 2019). O presente estudo demonstrou que ação combinada da IGIV com concentrações sub-inibitórias de meropenem, amicacina e colistina frente isolados MDR de *A. baumannii* causa diversos danos à célula bacteriana. E quando a esta combinação é adicionado o soro humano, pode ser verificada uma grande destruição de células. Estes resultados podem sugerir a análise do uso de preparações de IgG para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR.

REFERENCIAS

- AHMAD I. et al., Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, **Plos One**, p. 1-13, 2019.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm, acesso em 04 de janeiro de 2019.
- BASMA H. et al. Opsonic Antibodies to the Surface M Protein of Group A Streptococci in Pooled Normal Immunoglobulins (IVIG): Potential Impact on the Clinical Efficacy of IVIG Therapy for Severe Invasive Group A Streptococcal Infections. **Infection and Immunity**, p. 2279–2283, 1998.
- BREILH D. et al. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 1-17, fev., doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032, 2013.
- CAMPBELL DE., GEORGIU GM., KEMP AS. Pooled human immunoglobulin inhibits IL-4 but not IFN- γ or TNF- α secretion following in vitro stimulation of mononuclear cells with Staphylococcal superantigen. **Cytokine**, v. 11, n. 5, p. 359–365, 1999.
- CARVALHO BTC.; NUDELMAN V.; CARMEITO-SAMPAIO MMS. Mecanismos de defesa contra infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 74, s. 1, 1998.
- COELHO-CASTELO AAM et al. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**, Ribeirão Preto BR, v. 42(2), p. 127-42, 2009.
- CUSHNIE TP.; O'DRISCOLL NH.; LAMB AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016.
- DÍAZ-VISURRAGA J.; CÁRDENAS G.; GARCÍA A., Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, p. 307-315. 2010.
- DOI Y. et al. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36 (1), p. 85-89, doi: 10.1055/s-0034-1398388, 2015.
- ELHOSSEINY NM; ELHEZAWY NB.; ATTIA AS. Comparative proteomics analyses of *Acinetobacter baumannii* strains ATCC17978 and AB5075 reveal the differential role of type II secretion system secretomes in lung colonization and ciprofloxacin resistance. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 20-27, doi: 10.1016/j.resmic.2018.04.005, 2019.
- FAM N. et al., Antimicrobial Efficacy of Doripenem Colistin Combination on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by E-test Agar Dilution and Ultrastructural Methods, **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2017.

FARAG, N. et al. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 9, p. 1149-60, set. 2013.

LAUPLAND, KB. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the prophylaxis and treatment of infection in critically ill adults. **The Canadian journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 100-6, mar. 2002.

LEE S., KIM HW., KIM K. Functional antibodies to Haemophilus influenzae type b, Neisseria meningitidis, and Streptococcus pneumoniae contained in intravenous immunoglobulin products. **Transfusion**, v. 57, P. 157-165, 2017.

LEITE GC., et al., Effect of Antibiotics Combination and Comparison of Methods for Detection of Synergism in Multiresistant Gram-Negative Bacteria. **Journal Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 2, 2015.

LORENA VM, VERÇOSA AF, MACHADO RC, MOITINHO-SILVA L, CAVALCANTI MG, et al. (2008) Cellular immune response from Chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of Trypanosoma cruzi . J Clin Lab Anal 22: 91-98.

MACHADO PRL. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de janeiro BR, v. 79, p. 647-664, 2004.

MAIFIAH M. H. M., Untargeted metabolomics analysis reveals key athway sresponsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against *Acinetobacter baumannii*, **Scientific Reports**, v. 7, n. 45527, doi: 10.1038/srep45527, 2017.

MCCONNELL MJ.; ACTIS L; PACHÓN J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **Federation of European Microbiological Societies**. v.37, p. 130–155, 2013.

MIKOLAJCZYK MG. et al. Characterization of Antibodies to Capsular Polysaccharide Antigens of *Haemophilus influenzae* Type b and *Streptococcus pneumoniae* in Human Immune Globulin Intravenous Preparations. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, p. 1158–1164, 2004.

NEGM OH. Protective antibodies against Clostridium difficile are present in intravenous immunoglobulin and are retained in humans following its administration. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, p. 437–443, 2017.

MORAIS NG. et al. Immunological parameters of macrophages infected by methicillin resistant/sensitive Staphylococcus aureus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 2, p. 84-90, abril 2013.

- MORAIS NG. et al. Efeitos tardios da desnutrição neonatal na resposta microbocida, produção de citocinas e viabilidade de macrófagos na infecção por *Staphylococcus aureus* sensível/resistente a meticilina. **Revista de Nutrição**, v. 27(5), p.557-568, 2014.
- NORRBY-TEGLUND A et al. Varying Titers of Neutralizing Antibodies to Streptococcal Superantigens in Different Preparations of Normal Polyspecific Immunoglobulin G: Implications for Therapeutic Efficacy. **Clinical Infection Disease**, v. 26, p. 631-638, 1998.
- OLIVARES N. et al. A significant therapeutic effect of immunoglobulins administered alone, or in combination with conventional chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 9, 2017.
- ONO Y. Opsonic activity assessment of human intravenous immunoglobulin preparations against drug-resistant bacteria. **Journal Infection Chemotherapy**, v. 10, p.234–238, 2004.
- SALCEDO, J. et al. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. **Gut**, v. 41, n. 3, p. 366-70, set. 1997.
- SALLAM MM. ABOU-AISHA K; MOHAMED EL-AZIZI M. A novel combination approach of human polyclonal IGIV and antibiotics against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 9, P.301–311, 2016.
- SCANDORIEIRO S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2106.
- SCAVUZZI AML et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 1370–1377, 2016.
- SHI H. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1734–1742, 2017.
- TAITT CR. et al. Antimicrobial Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates Taken from Military Treatment Facilities, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.2, p.767-781, 2014.
- TANAKA J. et al. Complement-mediated bacteriolysis after binding of specific antibodies to drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: morphological changes observed by using a field emission scanning electron microscope. **Journal Infection Chemother**, v. 16, p. 383-387, 2010.
- TARNUTZER A. et al. Human polyspecific immunoglobulin attenuates group A streptococcal virulence factor activity and reduces disease severity in a murine necrotizing fasciitis model. **Clinical Microbiology and Infection**, p.1-7, 2018.

VERAS DL. et al. Ultrastructural Changes in Clinical and Microbiota Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Carriers of Genes *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M, or *bla*KPC When Subject to β -Lactam Antibiotics, **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, London, GB v. 8, n. 1, p. 27-39, doi: 10.2217/fmb.12.130, 2013.

WANG Z. et al., In vitro evaluation of the biological activities of IgG in seven Chinese intravenous immunoglobulin preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 317-323, 2018.

WOOD JB. et al., Commercial Intravenous Immunoglobulin Preparations Contain Functional Neutralizing Antibodies against the *Staphylococcus aureus* Leukocidin LukAB (LukGH). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, I. 11, 2017.

XIONG YQ. et al. A Human Biofilm-Disrupting Monoclonal Antibody Potentiates Antibiotic Efficacy in Rodent Models of both *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter Baumannii* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, I. 10, 2017.

YE S. et al., In vitro evaluation of the biological activities of IgG in seven Chinese intravenous immunoglobulin preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 151, p. 317–323, 2018.

ZHANG X. et al. A recombinant human IgG1 Fc multimer designed to mimic the active fraction of IVIG in autoimmunity. **JCI Insight**, v. 4, n. 2, p. 1-19, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121905>, 2019

6 CONCLUSÃO

Os isolados MDR de *A. baumannii* apresentam alta resistência ao meropenem. No entanto, quando submetidos ao meropenem/amicacina ou meropenem/colistina, pode-se verificar a presença de variadas concentrações sinérgicas. Assim como, uma diminuição bastante significativa das concentrações inibitórias mínimas. Na submissão de isolados de *A. baumannii* à Imunoglobulina G Intravenosa (IVIG) isoladamente e associada ao soro humano, em combinação com meropenem, amicacina e colistina, foi possível observar diferentes alterações ultraestruturais às células bacterianas.

Verificou-se também que o isolado de *A. baumannii* sensível aos antimicrobianos avaliados (meropenem, amicacina e colitina) apresentou visualmente maior ligação da IGIV à superfície da célula bacteriana quando submetido à IGIV isoladamente de diferentes combinações dos antimicrobianos.

Dessa forma, percebe-se que a IGIV associada ao meropenem, amicacina e colistina é uma alternativa altamente promissora no combate de infecções por *A. baumannii* MDR, que além de apresentar-se eficaz contra células bacterianas, apresenta também um baixo poder tóxico e reduzido efeitos colaterais. Assim, os dados apresentados neste estudo dão suporte à continuação do uso empírico e estimula análises *in vivo* com IGIV para a busca de novas opções terapêuticas para diferentes IRAS.

REFERÊNCIAS

- ABBAS A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Molecular e Celular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 89-108, 2012.
- ADAMS et al., Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 53, n. 9, p. 3628–3634, 2009.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm, acesso em 04 de janeiro de 2015.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos5.htm, acesso em 02 de Abril de 2019.
- ALAEI N, AZIEMZADEH M, BAHADOR A. Antimicrobial resistance profiles and genetic elements involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from a referral hospital in Southern Iran. ***Journal Globo Antimicrobial Resistance***, v. 5, p. 75-9, jun. 2016.
- AL-AGAMY MH. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. ***International Journal of Infectious Diseases***, v.22, p.49–54, 2014.
- AZIMI , et al. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. ***International Journal of Molecular and Cellular Medicine***, v. 4, n. 1, p. 46-56.
- BIOMEDICINA PADRÃO. <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2015/05/conheca-as-polimixinas.html>, Acesso em: 09 de abril de 2019.
- BOUCHER HW. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. ***Clinical Infectious Diseases***, v. 1, n. 48 (1), p.1-12, doi: 10.1086/595011. 2009.
- BREILH, D. et al. Carbapenems. ***Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)***, v. 25, n. 1, p. 1-17, fev. 2013.
- CARVALHO D.T. Antibióticos tetraciclínicos, anfenicóis, macrolídicos e aminoglicosídicos <https://slideplayer.com.br/slide/291769/>, acesso em: 09 de abril 2019.
- CAVALCANTI, C. L. B. Determinação dos mecanismos de resistência e virulência de isolados multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* obtidos de hospital público do Recife-PE. 2016. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

CHEAR S., Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. **Scientific Reports**, V.6, N. 26233.

DOI Y.; MURRAY GL.; PELEG AY. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36 (1), p. 85-89, doi: 10.1055/s-0034-1398388, 2015.

FARAG, N. et al. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 9, p. 1149-60, set. 2013.

FERRARA, G.; ZUMLA, A.; MAEURER, M. Intravenous immunoglobulin (IVIg) for refractory and difficult-to-treat infections. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 10, p. 1036.e1-8, 2012.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. **Healthcare Epidemiology**, v. 42, p. 692-699, 2006.

FIJIKURA Y et al., Blood stream infections caused by *Acinetobacter baumannii* group in Japan e Epidemiological and clinical investigation, **Journal Infection Chemotherapy**.; p. 1-6, 2016.

GOLAN D. E. et al. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, [s.l: s.n.], p. 674. 2009.

JV. PRIYADHARSINI; ASS. GIRIJA; A. PARAMASIVAM. An insight into the emergence of *Acinetobacter baumannii* as an oro-dental pathogen and its drug resistance gene profile e An in silico approach. **Heliyon**, v. 4 (12), p. 1-18, 2018.

KIM et al. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Medical Journal**, v. 50, p. 37-44, 2014.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6. ed. [s.l: s.n.], p.349-351, 2008.

KRAUSE KM. Et al. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, 2016.

LAUPLAND, K. B. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the prophylaxis and treatment of infection in critically ill adults. **The Canadian journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 100-6, mar. 2002.

LEGAREE, B. A; ADAMS, C. B.; CLARKE, A. J. Overproduction of penicillin-binding protein 2 and its inactive variants causes morphological changes and lysis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, US v. 189, n. 14, p. 4975-83, jul. 2007.

LEITE G. C., et al., Effect of Antibiotics Combination and Comparison of Methods for Detection of Synergism in Multiresistant Gram-Negative Bacteria. **Journal Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 2, 2015.

LEITE G. C. et al., Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. **Plos one**. v. 21, p. 1-16, 2016.

LIN M.; LAN C. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 16, n. 2 (12), p. 787-814, 2014.

MADIGAN, MT. et al. Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, p. 1-141, 2010.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1254-1263, 2008.

MCCONNELL M. J.; ACTIS L; PACHÓN J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 37, p. 130–155, 2013.

MILLER OS.; SCHAUF V.; SALO RJ. Enhanced Killing of Group B Streptococci In Vitro by Penicillin and Opsonophagocytosis with Intravenous Immunoglobulin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161; 1225-1230,1990.

MORAIS N. G et al. Immunological parameters of macrophages infected by methicillin resistant/sensitive *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 2, p. 84-90, abril 2013.

OLIVEIRA J. F. P., CIPULLO J. P., BURDMANN E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal Of Cardiovascular Surgery**, v. 21(4), p. 444-452, 2006

PILLAI S. K.; MOELLERING R. C.; ELIOPOULOS G. M., Antimicrobial combinations. In: Lorian, V., ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia: p.365-440, 2005.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.12, p. 826-836, 2006.

POLONELLI et al. Peptides of the Constant Region of Antibodies Display Fungicidal Activity. **PLoS ONE**. V. 7, n. 3, Março 2012.

RIBEIRO PCS. Phenotypic and molecular detection of the blaKPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, p. 737, 2016.

ROBLEDO I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. V. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.

RUSSO, T. A. et al., The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-

0294 Is a Major Virulence Factor. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3993-4000, 2010.

SAITO, T. et al. Evidence of intravenous immunoglobulin as a critical supportive therapy against *Clostridium difficile* toxin-mediated lethality in mice. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1096-9, maio. 2011.

SALCEDO, J. et al. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. **Gut**, v. 41, n. 3, p. 366-70, set. 1997.

SALLAM MM.; ABOU-AISHA K.; EL-AZIZI M. A novel combination approach of human polyclonal IVIG and antibiotics against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 9, p. 301–311, 2016.

SAMAWI M. S. A., *Acinetobacter* Infections among Adult Patients in Qatar: A 2-Year Hospital-Based Study. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2016, 2016.

SERIO AW. et al. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

SHAH PM.; ISAACS RD. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 538-542, 2003.

SKIEBE E. et al. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 302, p.117– 128, 2012.

SOARES T.; Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiadora* sp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). **Micron**, v. 48, p. 11–16, 2013.

TAITT C. R. et al. Antimicrobial Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates Taken from Military Treatment Facilities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 767–781, 2014.

TANAKA J. et al. Complement-mediated bacteriolysis after binding of specific antibodies to drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: morphological changes observed by using a field emission scanning electron microscope. **Journal Infection Chemother**, v. 16, p. 383-387, 2010.

TENOVER F. C. et al. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209-13, 2006.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p.569, 2012.

TRABULSI, L.R. e cols. Microbiologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006

TSENG et al., Altered susceptibility to the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO₂ is related to colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2016.

TURTON J. F. et al. The role of ISAbal1 in expression of OXAcarbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 258, p. 72–77, 2006.

TURTON J. F. et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 8, p. 807–815, 2007.

VIEIRA PB., PICOLI SU., *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2015.

VIEHMAN A.; NGUYEN M.; DOI Y. Treatment Options for Carbapenem-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Drugs**, v.74, n. 12, p. 1315–1333, Agosto, 2014.

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 27-39, 2013.

WONG D., NIELSEN TB., BONONO RA., PANTAPALANGKOOR P., LUNA B., SPELLBERG B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v.30 (1), 2017.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: the Molecular Epidemic Features of an Emerging Problem in Health Care Facilities. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 5, p. 335-341, 2009.

APÊNDICE A - TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **“Determinação molecular do perfil clonal, de resistência e virulência em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus spp.* e ação *in vitro* de combinações de antimicrobianos na ultra-estrutura e expressão da virulência bacteriana”**

Pesquisador Responsável

Fabio André Brayner dos Santos,
Local de trabalho: Fundação Oswaldo Cruz
(Fiocruz) – Pernambuco – Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães (CPqAM) – Av. Professor
Moraes Rego, s/n – Campus
da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE -
Brasil |
CEP: 50.740-465.
Telefone: (81) 2101.2687,
email: brayner@cpqam.fiocruz.br

**Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de Pernambuco:**

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Sala
4, UFPE - Cidade Universitária -
Recife/PE - Brasil | CEP: 50.740-465
Telefone: (81) 2126-8588 E-mail:
cepccs@ufpe.br

Convidamos o (a) Sr. (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa **“Determinação molecular do perfil clonal, de resistência e virulência em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus spp.* e ação *in vitro* de combinações de antimicrobianos na ultra-estrutura e expressão da virulência bacteriana”**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Fabio André Brayner dos Santos. Também participam desta pesquisa as pesquisadoras: Dra. Dyana Leal Veras, Telefones para contato: (81) 2101.2643 e a Msc. Fernanda Cristina Gomes de Lima, Telefone: (81) 2101.2693.

O objetivo desta pesquisa é estabelecer o perfil clonal e determinar a ocorrência dos genes de resistência e virulência em isolados multidroga-resistentes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. aureus* obtidos em três

hospitais públicos da cidade do Recife-PE, assim como determinar a ação *in vitro* e a capacidade de expressão dos principais fatores de virulência relatados nestas espécies bacterianas, antes e após a submissão dos isolados a diferentes antibióticos utilizados na prática clínica, sozinhos e em combinação. Sendo importante sua realização, pois com este estudo pretendemos obter um maior conhecimento sobre estas bactérias que causam diversas infecções hospitalares. E também disponibilizar para pesquisas posteriores uma base científica para o desenvolvimento de novos antibióticos para o combate dessas infecções com base nas características das bactérias encontradas em hospitais públicos do estado de Pernambuco.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e com o pesquisador responsável. E apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem fornecidos, caso concorde com a realização do estudo, gostaríamos de realizar cinco (5) coletas de amostras sanguíneas, com intervalos de quinze dias de uma coleta para outra. Em cada coleta, serão coletados 50ml de sangue do seu braço, utilizando material estéril (limpo) e adequado ao procedimento, visando a promoção de sua segurança.

O sangue coletado será utilizado nos experimentos relativos a este projeto, desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), localizado no departamento parasitologia, no 1º andar do prédio do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ – PE, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária.

Os riscos que você corre ao participar desta pesquisa estão associados com a coleta do sangue, que incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. No entanto, o presente projeto irá trabalhar para minimizar todo e qualquer risco implicado a pesquisa realizando a assepsia (limpeza) do local da coleta e utilizando agulhas e tubos estéreis (limpos). Sendo assim, serão seguidos os preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) conforme a Resolução 466/12 que regulamenta as diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos.

A sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhum prejuízo. Você não receberá nenhum

pagamento ou benefício por participar desta pesquisa, assim como também não terá nenhum gasto ou prejuízo financeiro. Porém, caso se sinta prejudicado de alguma maneira, garantimos que você receberá toda assistência necessária. Caso ainda tenha qualquer dúvida sobre esse termo ou sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável pela pesquisa, no endereço ou telefone descritos no início deste documento ou também no comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (endereço também citado no início do documento).

Eu, _____

(nome completo), RG (número da carteira de identidade): _____, entendi as informações passadas e concordo em participar voluntariamente desta pesquisa, permitindo que seja coletada uma amostra do meu sangue. Declaro também que estou ciente de: Que concordei em participar desta pesquisa por minha livre e espontânea vontade sem nenhum tipo de pressão. Em caso de alguma dúvida, em qualquer momento posso entrar em contato com o pesquisador responsável, e se desejar, retirar minha autorização e desistir de participar desta pesquisa. Declaro também que assinei duas vias deste documento, ficando uma via original comigo e a outra via permanecendo com o pesquisador responsável.

Assinatura do voluntário da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável pela pesquisa

_____, _____
Local e data

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

Successfully received: submission Ultrastructural changes caused by the combination of intravenous immunoglobulin with meropenem, amikacin and colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* for Microbial Pathogenesis  



Microbial Pathogenesis <Evisesupport@elsevier.com>
para eu ▾

12:24 (há 1 hora)



This message was sent automatically.

Ref: YMPAT_2020_145

Title: Ultrastructural changes caused by the combination of intravenous immunoglobulin with meropenem, amikacin and colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Journal: Microbial Pathogenesis

Dear Ms. Lima,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Microbial Pathogenesis. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=YMPAT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Microbial Pathogenesis

Ultrastructural changes caused by the combination of intravenous immunoglobulin with meropenem, amikacin and colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Fernanda Cristina Gomes de Lima^{1*}, Jorge Belém Oliveira-Júnior¹, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti Rosa², Dyana Leal Veras¹, Catarina Fernandes de Freitas¹, Jana Messias Sandes², Everton Moraes da Silva¹, Daivyane Aline Mota da Rocha¹, Luiz Carlos Alves^{1,2}, Fabio André Brayner dos Santos^{1,2}

Affiliation

¹ Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Parasitology, Institute Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE), Recife/PE.

² Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami/Universidade Federal de Pernambuco (Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Recife/PE. CEP: 50740-465).

Corresponding author:

*Address email: fernandalima.fel@gmail.com

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen associated with increased morbidity and mortality in Healthcare-associated infections (HAI). Combination antimicrobial therapy, meropenem, amikacin and colistin, has been used as an alternative in multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* infections due to reduced treatment options. However, these combinations are not always effective and exhibit high toxicity. Empiric therapy of intravenous immunoglobulin (IVIG) associated with antimicrobials has shown promising results in bacterial infections, considering the immunomodulatory action of IVIG. Thus, the aim of this study was to determine the combined antimicrobial action and to describe the ultrastructural changes caused in ten MDR *A. baumannii* isolates submitted to IVIG alone and in combination with colistin, meropenem and amikacin. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials and checkerboard were determined. Isolates were submitted to 4mg/mL of IVIG alone and in combination with different synergistic sub-MIC of antimicrobials tested, and processed for scanning electron microscopy. Nine bacterial isolates showed meropenem-resistant, two isolates had colistin-intermediate, and four isolates were considered intermediate to amikacin. Synergism in five isolates for meropenem/amikacin and meropenem/colistin were observed. Bacterial cells submitted to IVIG and meropenem, amikacin and colistin presented several ultrastructural changes, such as cell elongation and rupture, membrane roughness, incomplete cell division, cell surface “bubbles” and “depression”. *A. baumannii* isolates presented high resistance to meropenem and synergism among evaluated antimicrobials. In addition, it was possible to verify *in vitro* that IVIG associated with meropenem, amikacin and colistin is a promising alternative for MDR *A. baumannii* infections. Thus, these data support the continued empirical use and stimulate *in vivo* analyzes with IVIG to search for new therapeutic options for HAI.

Keywords

Acinetobacter baumannii, intravenous immunoglobulin g, minimum inhibitory concentration, checkerboard, electron microscopy.

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

Successfully received: submission In vitro evaluation of human intravenous immunoglobulin in combination with antimicrobials and human serum against multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* for Microbial Pathogenesis



Caixa de entrada x



Microbial Pathogenesis <Evisesupport@elsevier.com>
para eu ▾

13:26 (há 9 minutos) ☆ ↶ ⋮

inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

This message was sent automatically.

Ref: YMPAT_2020_155

Title: In vitro evaluation of human intravenous immunoglobulin in combination with antimicrobials and human serum against multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*
Journal: Microbial Pathogenesis

Dear Ms. Lima,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Microbial Pathogenesis. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evisesupport.com/evisesupport/faces/pages/navigation/NavController.jspx?_afac=ACR=YMPAT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards.

In vitro evaluation of human intravenous immunoglobulin in combination with antimicrobials and human serum against multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*

LIMA, F. C. G.^{1,2}; ARAUJO, A. R.²; NASCIMENTO, A. V.³; CAVALCANTI C. L. B.³; OLIVEIRA-JÚNIOR J. B.^{1,2}; VERAS D. L.²; FREITAS C. F.^{1,2}; SANDES J.M.³; ALVES L. C.^{2,3}; BRAYNER F. A.^{1,2,3}

¹POSTGRADUATE PROGRAM IN TROPICAL MEDICINE, FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO.

² PARASITOLOGY DEPARTMENT, INSTITUTE AGGEU MAGALHÃES / FIOCRUZ-PE.

³ KEIZO ASAMI IMMUNOPATHOLOGY LABORATORY, FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO.

ABSTRACT: The high incidence of multidrug-resistant isolates (MDR) of *Acinetobacter baumannii* has made the treatment of infections caused by this bacterial species a challenge, due to the reduction of available therapeutic options, making it necessary to use combinations of different antimicrobials for the treatment, such as meropenem, amikacin and colistin. In response to infections, occurs activation of the adaptive immune system in the human body. Antibodies against these pathogens are produced, mainly immunoglobulins G (IgG), acting as effector mechanisms such as neutralization, opsonization, phagocytosis and complement system activation. In recent decades, some studies have shown the important role of IgG against bacterial infections, empirical treatment with IgG and antimicrobial preparations has shown promising results, where the direct action of IgG, instead of restoring the immune system balance, has been the goal of therapy. The serious problem caused by the increase of multidrug resistance in *A. baumannii* isolates results in a constant search for therapeutic alternatives to defeat these infections. So, this study aims to verify in vitro the phagocytosis rate of the *A. baumannii* infected human monocytes, as well as to analyze possible

morphological changes induced by Intravenous Immunoglobulin G (IVIG) with human serum in association with antimicrobials. The phagocytosis rate and bacterial cell binding capacity of IVIG were determined for 2 isolates of *A. baumannii* species submitted to 4 mg/mL of human IVIG alone and in combination with different synergistic sub-MICs of meropenem, amikacin and colistin antimicrobials and processed for indirect immunofluorescence. Subsequently, these isolates were resubmitted and coupled with human serum and processed for scanning electron microscopy. There was no statistical difference for phagocytosis rates in the isolates tested. Bacterial isolates showed alterations in cell morphology when submitted to IVIG/human serum alone and in combination with antimicrobials such as alteration in shape, wrinkling, membrane depression and especially cell rupture with extravasation of cytoplasmic material. The isolates visually differed in the IVIG binding IVIG to the bacterial cell, with higher fluorescence intensity, which corresponds to the highest IVIG binding, in the isolate more sensitive to meropenem, amikacin and colistin. No differences between treatments were observed in the IVIG binding to the bacterial cell. The combined action of IVIG with meropenem, amikacin and colistin against *A. baumannii* MDR isolates induced several bacterial cell damages. And when associated with human serum, a massive destruction of cells can be observed. These results may suggest the analysis of the use of IgG preparations for the treatment of *A. baumannii* MDR infections.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Antimicrobials; Intravenous Immunoglobulin; Scanning Electron Microscopy; Phagocytosis rates; Indirect immunofluorescence.