

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

Palavras-Chave: *Acinetobacter baumannii*, biofilme, Sistemas de Secreção do Tipo VI

Autores(as):

MAYARA HIKARI KISHIDA, IB - UNICAMP

BIANCA BONTEMPI BATISTA, IB - UNICAMP

BRENNO WENDLER MIRANDA, IB - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. CRISTINA ELISA ALVAREZ MARTINEZ (orientadora), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), é uma bactéria Gram-negativa e integrante do grupo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), que engloba patógenos que são a principal causa de infecções nosocomiais em todo o mundo para as quais é necessário o desenvolvimento de novos tratamentos, devido sua multirresistência à antibióticos (De Oliveira *et al.*, 2020; Álvarez-Ainza *et al.*, 2024). As infecções causadas por *A. baumannii* estão associadas principalmente a pessoas submetidas à terapia intensiva e invasiva em ambiente hospitalar, sendo responsável por causar pneumonia, infecções urinárias e meningite. Uma característica que facilita sua adesão e persistência nesse ambiente, além de ser um fator de virulência, é a sua capacidade de produção de biofilmes em tecidos e em equipamentos médicos (Gregorio, *et al.*, 2015).

Os isolados de *A. baumannii* apresentam grande heterogeneidade entre si, uma consequência direta de seu genoma dinâmico devido sua capacidade de transformação natural por transferência horizontal de genes (Valcek *et al.*, 2023). Sendo assim, além de diferenciar em características moleculares, pode variar em aspectos fenotípicos, tal como a produção de cápsula. A cápsula da *A. baumannii* é composta por subunidades repetidas de oligossacarídeos de 4 a 6 açúcares, sendo responsável por limitar o reconhecimento do sistema imune, portanto funcionando como um mecanismo de evasão e virulência (Kon *et al.*, 2020). Ademais, a cápsula também atua como proteção contra o ataque de bactérias que possuem o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), uma maquinaria contrátil dependente de contato usada na competição interbacteriana, presente em diversas bactérias Gram-negativas, com a estrutura similar à cauda contrátil de bacteriófagos (Smith *et al.*, 2023).

A presença do T6SS confere um mecanismo importante para o fitness de *A. baumannii*, sendo descrito como uma vantagem para competição entre bactérias devido à injeção de toxinas efetoras e proteínas tóxicas em células eucarióticas e procarióticas, capazes de causar a lise da presa (Dong *et*

al., 2022). Algumas bactérias podem conter o T6SS ativo de forma constitutiva, mas no caso da *A. baumannii*, apesar do cluster responsável por codificar o T6SS ser bem conservado em diversos isolados, sua regulação é variada, sendo que em alguns casos, a expressão encontra-se silenciada (Weber *et al.*, 2015).

Assim, o projeto tem como objetivo realizar a caracterização genômica e fenotípica de 23 isolados clínicos de *A. baumannii*. Para a caracterização fenotípica iremos avaliar o crescimento bacteriano, a produção de biofilme, a formação de cápsula e a capacidade dos isolados em competir com outras espécies bacterianas por meio do T6SS. Para a caracterização genômica o DNA dos 23 isolados será extraído e sequenciado. Visamos comparar a presença de genes importantes para as características estudadas e a presença do cluster do T6SS entre os isolados.

METODOLOGIA:

Meios de cultura e condições de cultivo dos isolados de *A. baumannii*

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizados 23 isolados clínicos de *A. baumannii* doados pelo Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP. Estes foram conservados em glicerol 40% e armazenados em freezer a -80°C. A pesquisa está cadastrada no SisGen (A704008) e recebeu dispensa de apresentação e registro pelo sistema CEP/CONEP. A linhagem de *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como padrão dos ensaios fenotípicos realizados.

Para o cultivo seguiu-se os protocolos descritos por Jacobs e Zurawski (2014), a partir dos estoques em freezer a -80°C realizou-se o cultivo em placas contendo meio sólido Luria Bertani (LB) e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Em seguida, para obtenção de inóculos com culturas saturadas, colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido e mantidas sob agitação a 180 rpm, por 16 horas a 37°C.

Perfil de crescimento e análise de morfologia

As curvas de crescimento dos 23 isolados foram realizadas com base no protocolo previamente estabelecido por Rogers *et al.*, (2022), com algumas modificações. Primeiramente, 1,5 ml das culturas dos inóculos saturados de cada isolado foram centrifugadas a 5000 x g por 3 minutos, lavadas e ressuspensas. A DO_{600nm} foi normalizada para 0,01 e 200 µl destas culturas foram adicionadas em triplicata técnica à placa de 96 poços. A placa foi mantida sob agitação orbital a 600 rpm no leitor de placas multimodal Varioskan (Thermo Fisher Scientific) para leitura de DO_{600nm} a cada 15 minutos por 10 horas. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e os dados foram analisados por meio de ajuste a uma equação logística na linguagem de programação R, utilizando o pacote “Growthcurver” descrito por Sprouffske e Wagner (2016).

Para a análise de morfologia, seguindo o protocolo e classificação de Valcek *et al.*, (2023), 10 µl das culturas saturadas de cada isolado foram pipetadas em placas de 140 x 15 mm em meio Ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 7 dias. Os isolados foram agrupados de acordo com a classificação do autor.

Ensaio de cápsula

Seguindo o protocolo descrito por Valcek *et al.*, (2023), centrifugou-se 1 ml de cultura saturada a 7000 x g durante 2 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Desta ressuspensão, 875 µl foram misturados com 125 µl do reagente Ludox 30% (água/água; Sigma), e centrifugado por 30 minutos a 12000 x g. Utilizou-se a linhagem *E.coli* DH5α como controle negativo e a linhagem de *Klebsiella pneumoniae* 2146 (KP2146) como controle positivo de produção de cápsula. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e após a centrifugação, foram tiradas imagens dos tubos e as medidas foram feitas utilizando como referência a base inferior do tubo até metade da banda formada, por meio do software ImageJ.

Ensaio de biofilme

Para avaliar a formação de biofilme dos isolados, realizou-se de acordo com os protocolos previamente descritos por Vijayakumar *et al.*, (2016) e Coffey e Anderson (2014), com alterações. As culturas saturadas foram diluídas para DO_{600nm} de 0,05 em meio LB e 100 µl de cada isolado foi transferido para placas de 96 poços e incubada por 24 horas sem agitação a 37°C. Após incubação, procedeu-se com o descarte do sobrenadante e com a etapa de coloração do biofilme com solução de cristal violeta a 0,1% por 10 minutos, seguido de etapas de lavagens com água destilada. O biofilme foi eluído com 150 µl de ácido acético 30% por 10 minutos e a análise foi realizada pela leitura da DO_{550nm} no leitor de placas Epoch. Os ensaios foram feitos em quadruplicata técnica e biológica, e a *E.coli* DH5α foi utilizada como controle negativo.

Ensaio de competição inter bacteriana entre *A. baumannii* e *E. coli*

O ensaio de competição bacteriana foi realizado como em Weber *et al.*, (2013) com pequenas modificações. Assim, as linhagens foram inicialmente cultivadas em meio LB e as culturas foram diluídas para DO_{600nm} de 0,1 em meio LB fresco e incubadas a 37°C com agitação até DO_{600nm} ~ 1,0. Posteriormente, cada isolado foi misturado com a linhagem *E.coli* MG1655 resistente à rifampicina, na razão de 1:1 (predador: presa). Desta mistura, 5 µl foi colocado em filtros de membrana de MCE, tamanho de poro 0.22 µm, posicionados em placas contendo meio LB sólido. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 4 horas. Após decorrido o tempo, cada membrana foi ressuspendida em 500 µl de LB, realizou-se diluição seriada com PBS em placa de 96 poços, que foram cultivadas em meio sólido LB contendo rifampicina 200 µg/ml.

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico dos 23 isolados clínicos foi realizada utilizando o kit e protocolo para extração de DNA genômicos para bactérias Gram-negativas do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* da Promega. As amostras foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose de concentração 0,8% para verificar se não estavam degradadas, e foram quantificadas por meio do equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific), utilizando o método de fluorescência que se liga ao ácido nucléico de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A caracterização dos 23 isolados de *A. baumannii* foi iniciada com a análise do perfil de crescimento. Após realização de curvas de crescimento verificamos que os 23 isolados clínicos de *A. baumannii* apresentaram um perfil de crescimento muito semelhante, com exceção do isolado AB19 que apresentou uma taxa de crescimento diminuída em comparação com as demais. Nós também avaliamos a morfologia por macro colônia dos isolados clínicos seguindo a classificação de Valcek *et al.*, (2023). Assim, 1 isolado foi classificado no grupo C (colônias circulares de centro elevado com margens irregulares e translúcidas), 14 isolados no grupo D (colônias circulares com centro elevado), 2 isolados no grupo E (colônias circulares, centro plano e anel interno visível) e 6 isolados ao grupo F (colônia plana e anel interno visível com uma área translúcida ao redor).

Como os isolados apresentaram morfologias distintas, nós decidimos avaliar a produção de cápsula nessas linhagens. Considerando a densidade das bactérias foi estipulado o grau de encapsulação em baixo, médio e alto, conforme Valcek *et al.*, (2023). A linhagem de *E. coli* DH5α foi usada como um exemplo não produtora de capsula, enquanto a linhagem *A. baumannii* ATCC 19606 como um exemplo de médio grau de encapsulação. Nossos resultados demonstraram alta heterogeneidade entre os isolados, sendo classificados da seguinte forma: 1 como alto, 4 como médio/alto, 8 como médio, 3 como baixo/médio e 7 foram classificados como baixo/nulo, pois não se pode afirmar que estes não são produtores de cápsula por este ensaio.

Outro mecanismo importante para a sobrevivência de *A. baumannii* no ambiente hospitalar é a formação de biofilme. Visto que uma das nossas linhagens foi isolada de cateter intravenoso, verificamos a produção de biofilme nos 23 isolados clínicos. Todos os isolados demonstraram produção de biofilme, porém em diferentes níveis. De modo comparativo, identificou-se que AB19, AB21 e AB23 produzem mais biofilme que os demais.

Sendo na natureza ou no ambiente hospitalar as bactérias precisam competir com diferentes espécies para prosperar no ambiente. Assim, realizamos ensaio de competição interbacteriana para avaliar a capacidade dos isolados em atacar outras espécies. Já foi demonstrado que a linhagem de *A. baumannii* ATCC19606 possui um T6SS ativo, tendo sido verificada a secreção de HCP e a sua capacidade em competir contra *E. coli* (Weber *et al.*, 2013). Usando os mesmos parâmetros, com poucas modificações, verificamos que nenhum dos 23 isolados clínicos foram capazes de causar morte da linhagem de *E. coli* usada como presa. Assim, análises dos genomas dos isolados serão cruciais para esclarecer se há a presença do cluster do T6SS em seus genomas ou se eles podem estar silenciados.

Para as análises genômicas dos 23 isolados o DNA foi extraído. Após a extração do DNA genômico, verificou-se que nenhuma das amostras estava degradada através do gel de agarose e, através da quantificação com o Qubit, que as concentrações variaram entre 60 e 200 ng/ µl. As amostras estão sendo mantidas em geladeira a 4° até o envio para sequenciamento, que no futuro os resultados serão utilizados para análise genômica.

CONCLUSÕES:

O presente projeto realizou a caracterização dos 23 isolados clínicos à nível principalmente fenotípico. Podemos concluir até o momento que existe uma alta heterogeneidade entre os isolados. Os resultados trazidos demonstram importância de uma análise genômica para melhor compreensão, principalmente no que tange ao resultado apresentado no ensaio de competição, para averiguar a presença ou não do T6SS, além de eventuais repressores.

FINANCIAMENTO:

Este projeto contou com o financiamento PIBIC/CNPq e atualmente possui financiamento FAPESP processo 25/00091-3 (bolsa de IC) e Fapesp 2021/10577-0.

BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ-AINZA, M. L. *et al.* Antibiotic resistance of ESKAPE group-microorganisms in health institutions from Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, México. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 2024.
- COFFEY, B. M.; ANDERSON, G. G. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. **Methods in Molecular Biology**, v. 1149, p. 631–641, 2014.
- DE OLIVEIRA, D. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, nº3, 2020.
- DONG, J. F. *et al.* The type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and its roles in antimicrobial resistance acquisition. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, 2022.
- GREGORIO, E. DE *et al.* Biofilm-associated proteins: News from *Acinetobacter*. **BMC Genomics**, v. 16, nº 1, 2015.
- JACOBS, A. C.; ZURAWSKI, D. V. Laboratory maintenance of *Acinetobacter baumannii*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 2014, p. 6G.1.1-6G.1.6, 2014.
- KON, H. *et al.* Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test. **BMC Microbiology**, v. 20, nº 1, 2020.
- ROGERS, A. T. *et al.* Bacterial Growth Curve Measurements with a Multimode Microplate Reader. **Bio-protocol**, v. 12, nº 9, 2022.
- SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, v. 17, nº 1, 2016.
- SMITH, William P. *et al.* Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, nº8, p. 519–534, 2023.
- VALCEK, A. *et al.* Phenotypic Characterization and Heterogeneity among Modern Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, nº 1, 2023.
- VIJAYAKUMAR, S. *et al.* Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. **Frontiers in Public Health**, v. 4, 2016.
- WEBER, B. S. *et al.* Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter*. **PLoS ONE**, v. 8, nº 1, 2013.
- WEBER, B.S. *et al.* A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, nº 30, p. 9442–9447, 2015.