



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MIRIAN MARCOLAN DE MELLO

**ASSOCIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS E TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA O CONTROLE
DE *Acinetobacter baumannii***

2015

MIRIAN MARCOLAN DE MELLO

**ASSOCIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS E TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA PARA O CONTROLE DE
*Acinetobacter baumannii***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Mello, Mirian Marcolan de
Associação de antibióticos e terapia fotodinâmica antimicrobiana
para o controle de *Acinetobacter baumannii*. / Mirian Marcolan de
Mello. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.
80 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.
Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. *Acinetobacter baumannii* . 2. *Galleria mellonella* . 3.
Antimicrobianos . 4. Terapia fotodinâmica antimicrobiana . 5.
Resistência Microbiana a medicamentos. I. Junqueira, Juliana
Campos, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ
Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2015
E-mail: marcolanmirian@yahoo.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof.Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Fernanda Malagutti Tomé

UNIP – Universidade Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Renato Araújo Prates

UNINOVE – Universidade Nove de julho
Campus São Paulo

Prof. Dr Raduan Hage

UNIP – Universidade Paulista
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rani Ursula Tres Mareolan e Mário Mareolan, pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu grande e verdadeiro amor, Luiz Fernando Alam de Mello, pelo carinho e apoio incondicional, em todas as minhas tomadas de decisões, sem o qual não seria possível superar mais esta etapa da minha vida.

Aos meus filhos, Laura Mareolan de Mello e Lucas Mareolan de Mello, pelo carinho, paciência e compreensão. Tê-los ao meu lado, mesmo a considerar suas poucas idades, tornou minha caminhada mais suave e me deu forças para seguir em frente. Olhar nos olhinhos deles e ver a admiração brotar, sempre foi um incentivo a mais em minha trajetória.

A minha família Mareolan e Mello, irmãos cunhados e sobrinhos.

Aos amigos que não nasceram nesta família, mas que os laços de amizade verdadeira os tornaram parte da minha família.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, pelo convívio, orientação e dedicação.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pelo convívio, orientação técnica e conduta acadêmica.

*À aluna de doutorado Adeline Jorjão, a qual propiciou o uso do modelo invertebrado, pois estabeleceu a criação do modelo de *G. mellonella* no laboratório de invertebrados, juntamente com a Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira.*

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Estevao Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da Coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, no período de fevereiro de 2012 a dezembro de 2015.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa para aluna de Iniciação científica Naiara Pires Ramanzini (Processo número: 2014/03937-6), período de referência: 01/05/2014 a 10/07/2015, contribuindo na pesquisa, que possibilitou a aquisição de parte dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e à bibliotecária Renata Aparecida Couto Martins que orientou sua normalização.

Aos colegas de Pós-Graduação, que ao longo deste período contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste trabalho, bem como apoio, para superar momentos difíceis, fui acolhida com muito carinho. Michelle Peneluppi, Ana

Carolina Chipoletti, Adeline Joyjão, Marisol Velloso, Jonatas Rafael de Oliveira, Fernanda M. Tomé, Jéssica Diane dos Santos, Leileane Cohn, Lucas de Paula, Patrícia Pimentel, Junia Oliveira Barbosa, Simone Furgeri, Rodnei Rossoni, Rafaella Braga Santos, Isabella Amendola, Felipe Camargo, Felipe de Oliveira, Fernanda Freire, Elis Andrade Lima, Cristiane Pereira, Nádia Domingues, Ana Carolina Costa, Daiane de Jesus e Ana Luiza Palma.

A Naiara Pires Ramanzini, aluna de Iniciação Científica e Livia Figueiredo aluna de Mestrado, que contribuíram imensamente para realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Imunologia Sérgio Giovanni Alves e Domingo Gonçalves Pontes

Ao colega Jonatas Rafael de Oliveira e Ana Carolina Costa, pelo auxílio no desenvolvimento da técnica de Concentração Inibitória mínima dos isolados clínicos.

Ao laboratório Valeclin, que contribuiu cedendo as cepas de isolados clínicos, em especial aos responsáveis pelo setor de microbiologia deste laboratório, Silvio Rubens Alves e Renata Bernardes, que auxiliaram no processo de escolha, separação e acondicionamento dos isolados bacterianos.

Aos funcionárias da limpeza que sempre contribuíram para que pudéssemos trabalhar em ambiente higienizado e adequado.

A coordenação de Farmácia da Universidade Paulista-UNIP, pelo apoio concedendo meu afastamento das atividades docentes.

“ Professor não é aquele que ensina, mas o que desperta no aluno a vontade de aprender. ” Jean Piaget 1896-1980

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	21
2.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	24
2.3 Modelo <i>in vivo</i>: <i>Galleria mellonella</i>	27
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Micro-organismos e condições de crescimento	32
4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	33
4.3 Estudo <i>in vitro</i> da terapia fotodinâmica	34
4.4 Estudo <i>in vitro</i> da terapia fotodinâmica: Modelo de <i>G. mellonella</i>	37
4.4.1 Lagartas de <i>G. mellonella</i>	37
4.4.2 Preparo das suspensões bacterianas	39
4.4.3 Injeção do micro-organismo em <i>Galleria mellonella</i>	39
4.4.4 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>A. baumannii</i>	40
4.4.5 Curva de sobrevivência em <i>Galleria mellonella</i>	41
4.4.6 Estudo de terapias antimicrobianas para o tratamento da infecção experimental em <i>G. mellonella</i>	41

4.4.6.1	Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) na infecção experimental em <i>G. mellonella</i>	42
4.4.6.2	Tratamento com antibióticos convencionais na infecção experimental em <i>G. mellonella</i>	43
4.4.6.3	Tratamento combinado de antibióticos convencionais e PDT na infecção experimental em <i>G. mellonella</i>	43
4.5	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Isolados Clínicos	45
5.2	Concentração Inibitória Mínima (MIC)	46
5.3	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT)	47
5.4	Estudo <i>in vivo</i>: Terapia combinada de PDT e antibióticos na infecção experimental em <i>Galleria mellonella</i>	52
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	65
8	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de Jablonski, absorção de luz pelo fotossensibilizador, leva a sua transição para um nível energético superior, após o decaimento de energia, há formação de espécies reativas de oxigênio. 255
- Figura 2 - Colônias de *A. baumannii* em placa de Agar MacConkey. 333
- Figura 3 - Aplicação da Terapia fotodinâmica (PDT) em *A. baumannii* *in vitro*, usando um anteparo negro-fosco..... 366
- Figura 4 - Estudo *in vitro*: Diluições de *A. baumannii* após ação de PDT semeadas em ágar MacConkey. 366
- Figura 5 - Lagartas no último estágio e/ou já pupas, transformam-se em mariposas, após a copulação formam-se os ovos. 388
- Figura 6 - Incubação dos ovos com ração e cera, em estufa 28 °C, por 20dias. 388
- Figura 7 - Limpeza e manuseio com as lagartas, observar as *prolegues*. 39
- Figura 8 - Material injetado na hemolinfa da lagarta por meio da última *prolegue* esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 µL. 400
- Figura 9 - Durante curva de sobrevivência, observa-se escurecimento da cutícula após morte por infecção bacteriana..... 41

Figura 10 - Injeção de fotossensibilizador, observa-se escurecimento da cutícula com tonalidade azul, assim que é injetado os 10µL de Azul de Metileno (300 µM).	42
Figura 11 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de <i>A. baumannii</i> ao Imipenem.	46
Figura 12 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) da cepa padrão de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	48
Figura 13 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> sensíveis ao Imipenem e Meropenem para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	49
Figura 14 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> resistentes ao Imipenem e Meropenem para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	50
Figura 15 - Percentual de redução (%) de UFC/mL observado nos grupos Controle (P) em relação aos grupos Tratados com PDT para a cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 e para as 3 isolados sensíveis aos antibióticos Imipenem e Meropenem. P: representa o Grupo controle (L-F-).	51

Figura 16 - Percentual de redução (%) de UFC/mL observado nos grupos Controle (P) em relação aos grupos Tratados com PDT para a cepa de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 e para as 18 isolados resistentes aos antibióticos Imipenem e Meropenem. P: representa o Grupo controle (L-F-).	52
Figura 17 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de <i>G. mellonella</i> após a infecção com <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 nas concentrações de 10^5 , 10^6 e 10^7 células/lagarta.	533
Figura 18 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>A. baumannii</i> (10^6 células/lagartas) cepa ATCC 19606 e isolados sensíveis aos antibióticos Imipenem e Meropenem.....	54
Figura 19 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>A. baumannii</i> (10^6 células/lagartas) cepa ATCC 19606 e isolados resistentes aos antibióticos Imipenem e Meropenem.	54
Figura 20 - Curva de sobrevivência das lagartas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>A. baumannii</i> resistente à Imipenem e Meropenem (isolado A26). As lagartas infectadas foram tratadas com PBS, PDT, Imipenem ou terapia combinada de PDT + Imipenem.....	555
Figura 21 - Curva de sobrevivência das lagartas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>A. baumannii</i> resistente à Imipenem e Meropenem (isolado A26). As larvas infectadas foram tratadas com PBS, PDT, Meropenem ou terapia combinada de PDT + Meropenem	566

LISTA DE ABREVIATURAS

AHLs	= <i>N</i> -Acil-Homoserina Lactonas
AQS	= Quinolonas 2-Alquil-4B
BHI	= Infuso Cérebro-Coração
CIM	= Concentração Inibitória Mínima
CLSI	= <i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>
CRE	= Carbapenem Resistente <i>Enterobacteriaceae</i>
CR-KP	= Carbapenem-Resistente <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ESBL	= Espectro Estendido B-Lactamase
EUCAST	= <i>European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ERO	= Espécie Reativa De Oxigênio
IMP	= Imipenemase Metalo-B-Lactamase
KPC	= <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	= Lipopolissacarídeo
MBL	= Metalo-Carbapenemase
MHT	= Teste de Hodge Modificado
NDM	= Nova Deli Metalo-B-Lactamase
OXA	= Oxacillinase Classe D B-Lactamase
OXA	= Oxacillinase Serina
Omp	= Proteína De Membrana Externa
PDT	= Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
PBS	= Solução Fisiológica Tamponada
PS	= <i>Photosensitizer</i> - <i>Fotossensibilizador</i>
QS	= Quórum Sensing
Rpm	= Rotações Por Minuto
UFC/mL	= Unidade Formadora De Colônia Por ML
UTI	= Unidade De Terapia Intensiva
VIM	= Verona Codificado-Integrina Metalo-B-Lactamase

Marcolan MM. Associação de antibióticos e terapia fotodinâmica antimicrobiana para o controle de *Acinetobacter baumannii* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Devido ao rápido aumento dos micro-organismos resistentes aos antibióticos e ao desenvolvimento limitado de novos agentes antimicrobianos, as infecções por bactérias Gram-negativas estão se tornando um desafio para os profissionais da saúde e uma ameaça para a saúde pública internacional. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito sinérgico dos antibióticos convencionais associados a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) no controle de *Acinetobacter baumannii*. Para realização desse trabalho, foram obtidos isolados clínicos de *A. baumannii* do Laboratório de Análises Clínicas Valeclin da cidade de São José dos Campos/SP, identificados pelo método de bioquimismo e submetidos ao teste de difusão em disco para verificar a sensibilidade antimicrobiana. Os isolados selecionados foram transferidos para o ICT/UNESP, onde foi realizado testes para determinação da Concentração Inibitória Mínima aos antibióticos Imipenem e Meropenem seguindo as normas da CLSI. Cepas sensíveis e resistentes aos antibióticos foram avaliadas quanto a sensibilidade *in vitro* à terapia fotodinâmica antimicrobiana. Além disso, foram testados os efeitos dos antibióticos convencionais, da PDT e da terapia combinada de antibióticos e PDT nas infecções experimentais induzidas em *G. mellonella* por isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos antibióticos. Os resultados das terapias na infecção experimental foram avaliados por meio da curva de sobrevivência das lagartas de *G. mellonella*. Os dados dos testes *in vitro* foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisados pelo método de Log-rank. Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%. Nos resultados desse estudo, observou-se que o Laboratório Valeclin identificou 1,54% de amostras positivas para *A. baumannii* entre as 13.715 amostras clínicas analisadas em um período de 8 meses. Entre os isolados de *A. baumannii*, 58% demonstraram resistência aos antibióticos imipenem e meropenem por meio de teste de difusão em disco. A seguir 3 isolados clínicos sensíveis e 18 isolados resistentes a esses antibióticos foram selecionados para o presente estudo. O valor de CIM para os isolados sensíveis variou de <

0,5 a 1µg/mL e para os isolados resistentes de 64 a >128µg/mL. A PDT *in vitro* reduziu o número de células de *A. baumannii* em todos os isolados testados, mas o percentual de redução foi dependente dos isolados analisados. Além disso, verificou-se nos testes *in vivo*, que o tratamento com PDT, antibióticos (Imipenem e Meropenem) e associação de PDT+Antibióticos resultaram na sobrevivência das lagartas de *G. mellonella*, porém sem efeito sinérgico. Conclui-se que a PDT teve ação antimicrobiana contra isolados clínicos de *A. baumannii* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos, mas não apresentou efeito sinérgico quando associada com antibióticos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. *Galleria mellonella*. Antimicrobianos. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Resistência Microbiana a medicamentos.

Marcolan MM. Association of antibiotics and antimicrobial photodynamic therapy for the control of Acinetobacter baumannii [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Due to the rapid growth of microorganisms resistant to antibiotics and the limited development of new antimicrobial agents, infections by Gram-negative bacteria are becoming a challenge for health professionals and a threat to international public health. The aim of this study was to evaluate the synergistic effect of conventional antibiotics associated with antimicrobial photodynamic therapy (PDT) in control of Acinetobacter baumannii. In order to conduct this project were obtained clinical isolates of A. baumannii at the Clinical Laboratory Valeclin situated in the city of São José dos Campos / SP, identified by bioquimismo method and submitted to disk diffusion test to verify the antimicrobial sensitivity. The selected isolates were transferred to the ICT / UNESP, which were conducted tests to determine the Minimum Inhibitory Concentration to Imipenem and Meropenem antibiotics following the rules of the CLSI. Sensitive and resistant strains to antibiotics were evaluated in vitro sensitivity to antimicrobial photodynamic therapy. Besides, the effects of conventional antibiotics, and combined PDT, and PDT of antibiotics in experimental infections induced in G. mellonella by clinical isolates of A. baumannii resistant to antibiotic therapy were tested. The results of therapies in experimental infection were evaluated by survival curve of worms G. mellonella. Data from in vitro tests were submitted to ANOVA and Tukey test. The data obtained in G. mellonella survival curve were analyzed by log-rank method. In all tests it was considered 5% significance level. The results of this study, it was observed that the Valeclin Laboratory identified 1.54% of positive samples for A. baumannii between the 13,715 clinical specimens analyzed in a period of 8 months. Among the isolates of A. baumannii, 58% were resistant to antibiotic imipenem and meropenem by disk diffusion test. Next, 3 isolates clinical sensitive and 18 isolates resistant to those antibiotics were selected for this study. The MIC value for sensitive isolates ranged from 0.5 to < 1 μ g / mL and resistant isolates from 64 to > 128 μ g / mL. The PDT in vitro reduced the number of A. baumannii cells in all isolates tested, but the percentage of reduction was dependent on the analyzed isolates. Furthermore, it was found in in vivo tests, treatment with PDT, antibiotic (Imipenem and Meropenem) and PDT + Antibiotics association resulted in

the survival of G. mellonella caterpillars, but no synergistic effect. It was concluded that PDT has antimicrobial activity against clinical isolates of A. baumannii sensitive and resistant to carbapenems, but it had no synergistic effect when combined with antibiotics.

Keywords: Acinetobacter baumannii. Galleria mellonella. Antimicrobials. Antimicrobial photodynamic therapy. Drug resistance microbial.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico na área médica propiciou o desenvolvimento de equipamentos de diagnósticos de alta precisão, procedimentos cirúrgicos mais avançados e descoberta de novos medicamentos, acontecimentos esses que marcaram o aumento da sobrevida e expectativa de vida da população mundial. Em contrapartida, esses avanços tecnológicos não foram capazes de reduzir internações e óbitos causados por infecções, deparando-se com o aumento do número de mortes causadas por bactérias multirresistentes (Asencio et al., 2012, Lutz et al., 2012). Todos esses aditivos de novas tecnologias tornam-se inexpressivos quando um paciente apresenta uma infecção por bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis para tratamento das infecções. O tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos tornou-se um desafio, a constatar que, a partir de 2009 praticamente não houve novos antimicrobianos contra esse grupo de bactérias, no setor farmacêutico. Em 2011 foram encontrados alguns antimicrobianos que tinham atividade contra bacilo Gram negativo em desenvolvimento, mas nenhum deles chegou a fase 3 de testes (Russo et al., 2013).

O desenvolvimento de resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos contribuem significativamente para as infecções hospitalares. Os micro-organismos encontram nos pacientes hospitalizados um ambiente de extrema facilidade para sua multiplicação e desenvolvimento de seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Izadpanah, Khalili, 2015). As características dos pacientes internados, principalmente os que estão em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), preenchem os requisitos necessários para

colonização e multiplicação de micro-organismos patogênicos, como a vulnerabilidade imunológica e o desequilíbrio da microbiota residente. Além disso, esses pacientes são frequentemente submetidos a várias exposições aos antimicrobianos, muitas vezes atribuídas aos episódios de infecções recorrentes e internações anteriores (Winter et al., 2013). Segundo Winter et al. (2013), 58% dos pacientes internados na UTI do Hospital das Clínicas de Porto Alegre/Brasil e infectados por bactérias multirresistentes foram ao óbito após quatro semanas do início da infecção.

Gales et al. (2012) caracterizaram o perfil dos micro-organismos responsáveis por infecções hospitalares, utilizando como base de dados o Programa “Centro de Vigilância Antimicrobiana da América Latina”, no período de 2008 a 2010. Foram avaliados mais de 5.000 isolados clínicos, nos quais bactérias como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* ficaram entre as principais espécies de micro-organismos envolvidos nos casos de infecções da corrente sanguínea, pneumonia, infecções de pele ou tecidos moles. Em Infecções da corrente sanguínea, *Klebsiella* spp. foi o terceiro micro-organismo mais prevalente (12,3%), seguido por *Pseudomonas* spp. (7,5%) e *Acinetobacter* spp. (7,2%). Já nos casos de pneumonia, *P. aeruginosa* foi a espécie de maior prevalência (31,2%), aparecendo *Acinetobacter* spp. com (17,7%) seguido por *Klebsiella* spp. (10,2%). Nas infecções de pele, *Pseudomonas* spp. com (13,8%), seguida por *Klebsiella* spp. (10,4%) e *Acinetobacter* spp. (9,9%).

Em busca por descrever o perfil das infecções hospitalares, Zorgani et al. em 2015 caracterizaram agentes infecciosos e padrões de resistência aos antibióticos advindos de infecções nosocomiais, causadas pela utilização de dispositivos como cateteres, tubos endovenosos, drenos, entre outros, em unidade de terapia intensiva. Durante um ano colheram informações de 363 pacientes hospitalizados, dentre esses 79 pacientes apresentaram infecções

hospitalares associadas a uso de dispositivos. Essa pesquisa apontou *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (30, 20 e 14%, respectivamente), como os organismos mais frequentemente isolados. Sendo que os isolados de *A. baumannii* apresentaram níveis extremamente altos de resistência a todos os antibióticos, exceto colistina que foi 100% sensível. Além disso, 56,3% dos isolados de *A. baumannii* foram considerados resistente a múltiplas drogas (Zorgani et al., 2015).

A. baumannii é intrinsecamente resistente a muitos antibióticos e tem uma notável capacidade para desenvolver e transmitir novos mecanismos de resistência, tornando o tratamento extremamente difícil, com opções terapêuticas disponíveis limitadas. As infecções causadas por *A. baumannii* estão associadas a uma mortalidade significativa (taxas de mortalidade de 20 a 37%) e um aumento do tempo médio de permanência na UTI por 15 dias. Na Austrália, a prevalência de *A. baumannii* em UTIs é estimado na faixa de 4 a 20%, ao passo que os números relatados na Ásia, Europa e América do Norte são 19, 23 e 4%, respectivamente (Doan et al., 2015)

O anseio por novas terapias que possam destruir os micro-organismos sem induzir o aparecimento de cepas resistentes indesejáveis se faz necessário e também de extrema urgência, pois o arsenal de antibióticos preconizados seguros ao indivíduo, contra os micro-organismos intitulados como multirresistente, tem se tornado restrito. Frente a esse panorama surge a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT), a qual sugere vantagens sobre a terapia antibiótica tradicional, pois propõem agregar seu potencial, melhorando a condição bactericida dos antibióticos já empregados na terapia convencional (Sperandio et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Micro-organismos resistentes aos antibióticos tem se revelado cada vez mais emergentes, tanto a nível hospitalar quanto ambulatorial (Sharma et al., 2011a; Winter et al., 2013), demonstrando um panorama alarmante, no qual se destaca bactérias Gram-negativas, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Esses micro-organismos, até pouco tempo eram vistos como inofensivos e atualmente são tratados como potencialmente letais (Vidaillac et al., 2012; Gales et al. 2012), isso conseqüentemente gera buscas por novas terapias para o controle desses micro-organismos sem induzir o aparecimento de cepas resistentes.

Frente a essa realidade, segue uma revisão bibliográfica que inclui o micro-organismo em estudo *A. baumannii*, terapia fotodinâmica antimicrobiana, bem como o modelo hospedeiro de invertebrado *G. mellonella* utilizado nesse trabalho.

2.1 *Acinetobacter baumannii*

Em relação ao gênero *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* é a espécie mais comumente encontrada em amostras clínicas humanas e também a maior responsável por infecções adquiridas em hospitais, tendo em vista sua facilidade de transmissão entre profissionais da saúde e do meio ambiente em geral, como sobrevivência em superfícies abióticas sob condições secas durante várias semanas (Gayoso et al., 2014). Em

estudo de 222 casos deste gênero, pode-se eleger *A. baumannii* como sendo a espécie de maior prevalência no âmbito hospitalar com 89%, seguido de 8% de *Acinetobacter nosocomialis* e 3% de *Acinetobacter pittii*, destacando-se que a sobrevivência mais expressiva dos pacientes, está nas duas últimas espécies (Chusri et al., 2014).

Bactérias do gênero *Acinetobacter* consistem em cocobacilos Gram-negativos imóveis, aeróbios, geralmente dispostos em pares, não-fermentadores de carboidratos, oxidase negativa, catalase positiva, indol negativo, nitrato negativo e classificada na família Moraxellaceae e no gênero *Acinetobacter*. As espécies de *Acinetobacter* apresentam excelente capacidade de formar biofilme e resistência intrínseca e adquirida a uma gama de antibióticos (Winn et al., 2008; Kim et al., 2014). Dentre os fatores de virulência está um exopolissacarídeo capsular, composto por ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico, os quais conferem maior patogenicidade as cepas produtoras desta cápsula (Joly-Guillou et al., 2005; Russo et al., 2013).

Afim de promover o conhecimento do perfil de sensibilidade da espécie, um estudo foi realizado com 213 isolados clínicos de *A. baumannii* de pacientes em enfermarias (56), UTI (143) e cirurgia (14), do laboratório de bacteriologia do Instituto "Marius Nasta" de Pneumophthisiology (Romenia), no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2013. Foi encontrado o seguinte perfil de resistência aos antibióticos: carbenicilina (87,3%), ceftriaxona (87,3%), cefoperazona com sulbactam (84,9%), ceftazidima (79,3%), carbapenems (imipenem e/ou meropenem 75,1%), fluoroquinolonas (ciprofloxacina e 73,7%), cefepima (66,6%), piperacilina com tazobactam (62,4%), amicacina (50,2%), netilmicina (45%), gentamicina (42,7%) e tobramicina (35,6%). Este estudo demonstrou resistência para quase todos os antibióticos testados, com exceção de colistina, o qual torna-se o antibiótico de eleição no tratamento destas infecções. O estudo relatou que não foram encontradas diferenças significativas entre a resistência aos antibióticos das cepas

isoladas de pacientes internados em UTI, em comparação aqueles obtidos a partir de alas médicas ou cirúrgicas (Moisoiu et al., 2014).

Tien et al. (2012) demonstraram o crescente desenvolvimento de resistência de *A. baumannii* aos agentes antimicrobianos de última geração que estão disponíveis para tratamento clínico. Esses autores compararam percentuais de cepas resistentes ao longo dos anos, e verificaram que, em Taiwan, em 2000, a resistência ao antimicrobiano Imipenem era de 22%, passando para 57% em 2006. Já os dados de 2008, revelaram que 65 e 68% das cepas de *A. baumannii* apresentavam resistência respectivamente, aos antibióticos Imipenem e Meropenem (Tien et al., 2012). Dados mais atualizados, apresentam *A. baumannii* com 90% de resistência aos carbapenêmicos em países da América Latina, e atribuem essa resistência a presença de oxacillinases OXA-23, OXA-58 (no Brasil) e OXA-143 (Labarca et al. 2014). Kim et al. (2014) descreveram que a OXA-23 oxacillinase é responsável pela maior parte da resistência aos carbapenêmicos nos EUA e Europa.

Em estudo da epidemiologia de *Acinetobacter baumannii* em hospital libanês, pesquisadores chamaram atenção para uma característica deste micro-organismo, que tem sido encontrado amplamente causando infecções na comunidade como infecções de pele, tecidos moles e pneumonias. Foram analisados 116 isolados clínicos hospitalares, sendo que aproximadamente 60% apresentaram fenótipo de resistência a carbapenêmicos, com produção de OXA-23 (Rafei et al., 2015).

A resistência aos antibióticos carbapenêmicos pelas cepas de *A. baumannii* pode resultar da produção de β -lactamases (carbapenemases), de alterações nas porinas da membrana externa, a qual bloqueia a entrada do antibiótico, ou da super-expressão da bomba de efluxo (Lemos et al., 2014). As bombas de efluxo caracterizam-se pela presença de proteínas localizadas na membrana externa do micro-organismo com capacidade de bombear substâncias para fora da célula,

determinando a expulsão dos antibióticos do meio interno para o meio externo da célula bacteriana (Tseng et al., 2009; Prates et al., 2011).

A resistência a carbapenêmicos é muitas vezes mediada por oxacillinases serina (OXAs), que são codificadas pelos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58}, e genes das famílias VIM, IMP e SIM. A resistência a carbapenêmicos e isolados de *A. baumannii* é frequentemente devido à produção de OXA, enquanto a produção de metalo-carbapenemase (MBL) é mais prevalente em isolados do gênero *Acinetobacter*, mas da espécie “não” *A. baumannii* (Kim et al., 2014).

Na busca por compreender a virulência e mecanismos de resistência deste gênero, comparando cepas de *Acinetobacter baumannii* sensível e cepas resistentes aos carbapenêmicos, em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*, Chusri et al. (2014) atestam não ter sido observada diferença significativa na sobrevivência entre as lagartas infectadas com cepas resistentes ou sensíveis aos carbapenêmicos. Neste mesmo estudo foi avaliado a sobrevivência das larvas entre espécies diferentes, puderam também observar que houve maior sobrevivência das lagartas quando estas foram infectadas com cepas de *Acinetobacter* não *baumannii*, como *A. nosocomialis* e *A. pittii*, e menor sobrevivência das lagartas quando infectadas por *A. baumannii* sensível ou resistente aos carbapenêmicos (Chusri et al., 2014).

2.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A *Antimicrobial Photodynamic Therapy* (PDT) pode ser uma terapia alternativa para controlar micro-organismos patogênicos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos. Essa terapia contribui para eliminação do micro-organismo, sem provocar o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos,

apresentando assim uma vantagem em relação à terapia de antibióticos tradicional (Sperandio et al., 2013).

PDT é uma reação fotoquímica não-térmica que envolve a presença simultânea de luz visível, oxigênio e um fotossensibilizador (PS), este quando se liga ao micro-organismo seguido de fotoestimulação, gera espécies reativas de oxigênio (ERO). A geração de ERO pode inativar várias classes microbianas, incluindo bactérias, fungos, parasitas e estruturas virais (Dovigo et al., 2011; Sperandio et al., 2013). A geração de ERO como consequência da PDT segue dois caminhos principais, caracterizados por diferentes mecanismos fotoquímicos chamado de "tipo I" e "tipo II" (Figura 1). O PS deve ser excitado pela luz visível de comprimento de onda ressonante (comprimento de onda absorvido pelo PS) para entrar em um estado *triplete* de longa duração. Este estado particular do PS pode então interagir com o oxigênio molecular por transferência de energia (Tipo II) ou por processo de transferência de elétrons (Tipo I), mecanismo tipo II levará a produção de oxigênio *singlete* enquanto tipo I vai formar ânion superóxido que podem passar a formar ROS mais reativas, como os radicais hidroxila, evidenciado na figura 1 (Castano et al., 2004).

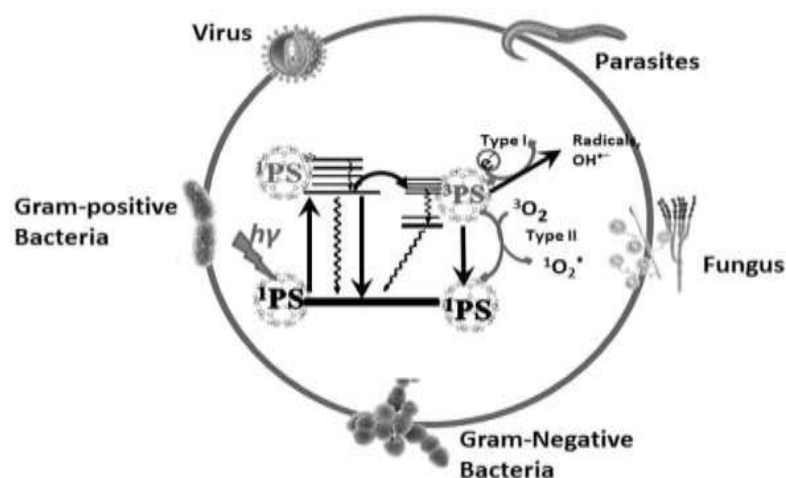


Figura 1 - Geração de ERO como consequência da PDT, seguindo dois caminhos, "tipo I" e "Tipo II" (Sperandio et al., 2013).

A escolha do PS, para realização da PDT, é de extrema importância afim de erradicar células microbianas, causando o mínimo de dano ao tecido do hospedeiro. O PS ideal deve possuir baixos níveis de toxicidade no escuro e presença de bandas de absorção na janela óptica de 600-900 nm (comprimento de onda longo geralmente luz vermelha) para penetração de luz suficiente no tecido, também deve ter um alto rendimento no estado *triplete* (Sharma et al., 2011b; Castano et al., 2004).

O desenvolvimento de cepas de bactérias multi-resistentes é uma ameaça para a saúde pública, surgindo principalmente ao uso excessivo de antibióticos. A PDT é considerada como uma abordagem alternativa, para infecções resistentes e tem a vantagem adicional de não levar à seleção de cepas resistentes. Mas para essa estratégia terapêutica ser efetiva, pontos como a estrutura bacteriana devem ser observados. Enquanto as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa e porosa de camadas de peptidoglicano interligadas, as Gram-negativas têm uma membrana exterior, com uma camada mais fina de peptidoglicano, com uma bicamada lipídica dupla envolvendo a camada de peptidoglicano, mais uma camada exterior de lipopolissacarídeo, o que resulta em um baixo grau de permeabilidade para pequenas moléculas lipofílicas. Já a parede celular de fungos tais como *Candida* mostra uma permeabilidade intermediária entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, considerando assim bactérias Gram-negativas com menor efetividade a PDT, comparada aos outros micro-organismos (Dai et al., 2009).

Tegos et al. (2008) relataram que uma expressão gênica elevada para bomba de efluxo em algumas cepas de *Candida albicans*, reduzem a quantidade de fotossensibilizador no interior da célula microbiana, prejudicando assim a eficácia da PDT. Com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana desta terapia, Hashimoto et al. (2012) utilizaram hipocrelina B, associado ao verapamil como modelo

bloqueador da bomba de efluxo do micro-organismo. Para tanto, os autores desenvolveram um modelo de infecção experimental de queimadura em camundongos, nos quais as lesões foram infectadas por cepas clínicas de *P. aeruginosa* e posteriormente tratadas com PDT. Os resultados demonstraram que este método reduziu significativamente a carga bacteriana nas lesões, e os níveis da bactéria no sangue foram de 2 a 3 Log abaixo do grupo controle (não tratado com PDT).

Huang et al. (2012) estudaram a PDT, em modelo murino, com e sem artrite em joelho, provocada por *Staphylococcus aureus* resistente a Metilina. Os autores verificaram o efeito redutor da infecção por ação direta ao micro-organismo. E utilizaram este método com azul de metileno no tecido de forma preventiva. Observaram uma forte ativação nos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, principalmente com migração imediata de neutrófilos para o local da aplicação, efeito esse que não apresentou resultados satisfatórios quando apenas aplicado o laser ou o fotossensibilizador separadamente no tecido.

Entre as principais indicações da terapia fotodinâmica antimicrobiana estão os tratamentos de infecções localizadas, como as dentárias, dos tecidos moles bucais e as dermatológicas (Fuchs et al., 2007; Di Poto et al., 2009; Maisch et al., 2011; Kharkwal et al., 2011; Dai et al., 2009).

Dai et al. (2009), testaram a terapia fotodinâmica sobre isolado clínico multirresistente de *A. baumannii* em modelo de infecção de pele por queimadura em ratos. Os autores observaram que a PDT reduziu significativamente as células de *A. baumannii* e impediu que essa bactéria penetrasse profundamente na pele animal.

2.3 Modelo *in vivo*: *Galleria mellonella*

Vários estudos *in vivo* de terapia fotodinâmica antimicrobiana foram realizados em modelos vertebrados de ratos e camundongos (Teichert et al., 2002; Junqueira et al., 2009; Mima et al., 2010; Martins et al., 2011; Costa et al., 2012). Mas até o momento a maioria dos estudos de PDT foram realizados *in vitro*, utilizando modelos de micro-organismos em crescimento planctônico (Souza et al., 2006; Rossoni et al., 2010; Myabe et al., 2011) ou organizados em biofilmes (Pereira et al., 2011; Junqueira et al., 2011). Como modelos *in vitro* impossibilitam o estudo da interação patógeno-hospedeiro e modelos *in vivo* em ratos e camundongos apresentam limitações éticas, estudos recentes desenvolveram um novo modelo de estudo de PDT em animais invertebrados, utilizando *Galleria mellonella* como modelo de infecção (Chibebe Junior et al., 2013).

G. mellonella, inseto conhecido popularmente como a larva do bicho da cera, vem sendo amplamente utilizada como modelo hospedeiro alternativo aos modelos mamíferos para o estudo das respostas do hospedeiro frente à infecção por patógenos. O uso de um modelo hospedeiro invertebrado para o estudo da patogênese microbiana e para a verificação da eficácia de agentes antimicrobianos apresenta vantagens quando comparado ao modelo vertebrado, como: não há implicação ou restrição legal ou ética em sua utilização; os animais não precisam ser anestesiados; pode ser utilizado em larga escala, gerando grande número de amostras por grupo e apresentam baixo custo (Jander et al., 2000; Mylonakis et al., 2005; Aperis et al., 2007; Peleg et al., 2009; Fuchs et al., 2010; Desbois, Cote, 2011).

A correlação entre os padrões de virulência expressos em *G. mellonella* e mamíferos tem sido demonstrada em infecções experimentais induzidas por uma ampla variedade de bactérias e fungos. Diversos autores encontraram tal relação quando estudaram a virulência dos patógenos desenvolvida no modelo invertebrado e no modelo vertebrado (Kavanagh, Reeves, 2004; Desalermos et al., 2012). Entre os

micro-organismos que tiveram sua patogênese estudada em *G. mellonella* pode-se destacar: *A. baumannii* (Peleg et al., 2009; Gaddy et al., 2012), *P. aeruginosa* (Jander et al., 2000; Miyata et al., 2003), *K. pneumoniae* (Insua et al., 2013), *Francisella tularensis* (Aperis et al., 2007), *Yersinia pseudotuberculosis* (Champion et al., 2009), *S. aureus* (Desbois et al., 2011), *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans* (Abranches et al., 2011; Olsen et al., 2011), *Enterococcus faecalis* (Yasmin et al., 2010, Michaux et al., 2011) *Enterococcus faecium* (Lebreton et al., 2011, Chibebe et al., 2013), *Candida albicans* (Fuchs et al., 2010; Junqueira et al., 2011) e *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2005).

G. mellonella apresenta sistema imunológico comparado aos dos vertebrados, sendo que a resposta imune é imediatamente acionada quando algum agente atravessa sua cutícula. A resposta imunológica desse animal é composta por sistema imune humoral e celular. O componente celular é representado pela ação de células fagocitárias denominadas hemócitos, que circulam livremente pela hemolinfa do inseto e estão envolvidas na fagocitose de células invasoras. O componente humoral é composto essencialmente por peptídeos antimicrobianos, que atuam nas células bacterianas ou fúngicas invasoras, que alcançam a hemolinfa. A densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa pode ser utilizada como indicativo de infecção (Olsen et al., 2011; Desalermos et al., 2012).

Chibebe et al. (2013) utilizaram larvas de *G. mellonella* infectadas por *E. faecium* com a finalidade de desenvolver um modelo hospedeiro de invertebrado para o estudo *in vivo* da terapia fotodinâmica antimicrobiana (isolada ou em associação com antibióticos). Esses autores verificaram que o tratamento das larvas com terapia fotodinâmica, mediada por azul de metileno, prolongou a sobrevivência das larvas, sugerindo que *G. mellonella* pode ser um modelo útil para o estudo da PDT. O fotossensibilizador foi facilmente injetado na hemolinfa do inseto e, devido a presença de uma cutícula clara e translúcida no corpo da

larva, a luz irradiada foi capaz de alcançar e excitar as moléculas do fotossensibilizador, gerando o processo fotodinâmico. Posteriormente, os autores infectaram larvas de *G. mellonella* com uma cepa de *E. faecium* resistente à vancomicina, e verificaram que o tratamento associado de PDT e vancomicina resultou em um aumento significativo da sobrevivência das larvas quando comparado ao tratamento isolado de PDT ou ao tratamento isolado de vancomicina. Esses dados demonstraram que após a aplicação de PDT, a cepa de *E. faecium* que era resistente à vancomicina tornou-se mais susceptível a esse antibiótico, possivelmente a permeabilização da parede celular bacteriana provocada pela PDT pode ter facilitado a entrada da vancomicina no interior da célula de *E. faecium*.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- a) determinar a concentração inibitória mínima dos antibióticos Imipenem e Meropenem para isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*;
- b) avaliar a ação da PDT sobre culturas planctônicas de *A. baumannii*, comparando isolados sensíveis e resistentes aos antibióticos em relação a sensibilidade à PDT;
- c) testar a ação dos antibióticos convencionais, da PDT e da terapia combinada de antibióticos e PDT nas infecções experimentais induzidas em *G. mellonella* por isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos antibióticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e condições de crescimento

Para o estudo proposto foram utilizados 21 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, sendo 18 resistentes e 3 sensíveis aos carbapenêmicos, previamente identificados nos laboratórios de origem pelo método Bioquimismo (Rugai, Enterokit C, Kit NF). As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Valeclin, dentro do Hospital Santa Casa da cidade de São José dos Campos, São Paulo. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) Campus de São José dos Campos, sob registro nº 24409813.9.0000.0077, o qual encontra-se no ANEXO C.

Como micro-organismos controle para todos os experimentos, foi utilizada uma cepa padrão cedida pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, sob-registro *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606).

A cepa padrão e os isolados clínicos foram mantidas em estoque em caldo infuso cérebro-coração (BHI, Himedia®, Mumbai, Índia) com 20% de glicerol à temperatura de menos 70 °C no freezer do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT/UNESP. Para ativação desses micro-organismos, as cepas foram cultivadas em caldo BHI (37 °C por 24 h), a seguir semeadas em ágar MacConkey (Himedia®, Mumbai, Índia), incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h (Figura 2).

As cepas clínicas obtidas foram submetidas ao teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima e estudo da terapia fotodinâmica antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*.

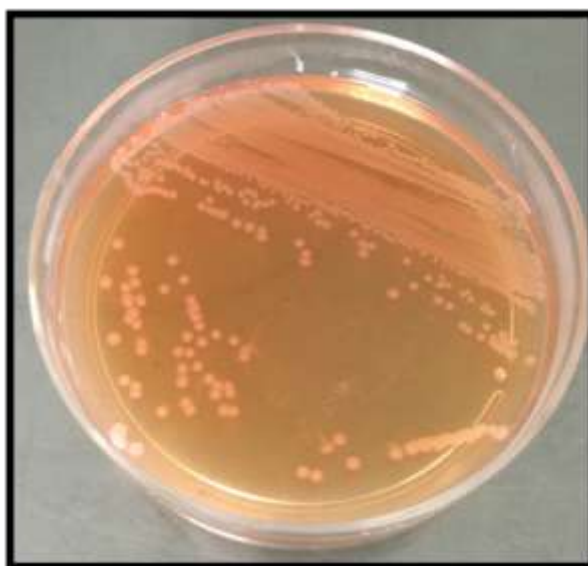


Figura 2 - Colônias de *A. baumannii* em placa de Agar MacConkey, colônias planas, discretamente mucóides de coloração branco-acinzentada com diâmetro de cerca de 1,5 a 3mm, atmosfera de ar à temperatura de 37 °C.

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os isolados obtidos foram submetidos aos testes de Concentração Inibitória Mínima para os antibióticos de uso clínico. Entre esses, foram selecionados os carbapenêmicos, representados pelo Imipenem e Meropenem (Sigma-Aldrich St. Lois, EUA).

Os testes para determinação da Concentração Inibitória Mínima foram realizados seguindo o protocolo de microdiluição em caldo estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* documento M07-A9, 2012. Suspensões padronizadas dos micro-organismos foram preparadas em solução fisiológica a partir de colônias

isoladas em ágar infuso cérebro-coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia). A densidade óptica da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). A absorvância em 625 nm foi ajustada entre 0,08 a 0,10, que corresponde à solução padrão Mc Farland 0,5, resultando em uma concentração de 10^8 UFC/ml de células bacterianas.

Soluções estoques dos antibióticos Imipenem e Meropenem (Sigma-Aldrichl St. Lois EUA) foram preparadas e diluídas serialmente em Caldo Mueller-Hinton (Difco Mumbai, Índia) nas placas de microtitulação de 96 poços (KASVI K12-096; China). A seguir, foram acrescentados os inóculos das suspensões padronizadas de cada micro-organismo. Após 24 h de incubação em estufa a 37°C, os valores de MIC foram determinados pela observação da turvação do meio nas placas de microtitulação. O valor do MIC foi definido como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os pontos de corte de sensibilidade e resistência para os antibióticos testados foram interpretados de acordo com o CLSI M100-S23, considerando-se os seguintes valores: Imipenem (Sensível ≤ 4 e resistente ≥ 16) e Meropenem (Sensível ≤ 4 e resistente ≥ 8).

4.3 Estudo *in vitro* da terapia fotodinâmica

Para realização da fotossensibilização *in vitro* foi utilizado azul de metileno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) como fotossensibilizador, na concentração de 300 μ M (Souza et al., 2006). A fonte de luz foi um laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esse fotossensibilizador, potência de 50 mW e densidade de energia de 15 J/cm².

Foi preparada suspensão de cada isolado clínico contendo 10^6 células/mL. Para o preparo dessa suspensão, o isolado foi semeado em ágar MacConkey (Himedia) e incubada a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. A seguir, esses micro-organismos foram cultivados em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI) por 24 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$. O crescimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica e centrifugado a 5000 rpm (MPW-350, Med. Instruments) durante 10 min, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido e o sedimento ressuspenso em 5 mL de solução fisiológica. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm com densidade óptica entre 0,6 a 0,8 o que corresponde a 10^8 células / mL (Dai et al. 2009). Com o propósito de confirmar o número de células bacterianas no inóculo utilizado, foi realizada a contagem de UFC/mL. Alíquotas das diluições seriadas do inóculo foram semeadas em placas de ágar BHI ($37\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h) para contagem de UFC/mL.

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foram adicionados 0,1 mL da suspensão de cada cepa de micro-organismo e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de solução fisiológica tamponada (PBS). A seguir, a placa contendo as amostras foram agitadas durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado (Figura 3) de acordo com os grupos a seguir: Fotossensibilizador e Laser (F+L+), Solução fisiológica e Laser (F-L+), Fotossensibilizador sem Laser (F+L-) e Solução fisiológica sem Laser (F-L-).

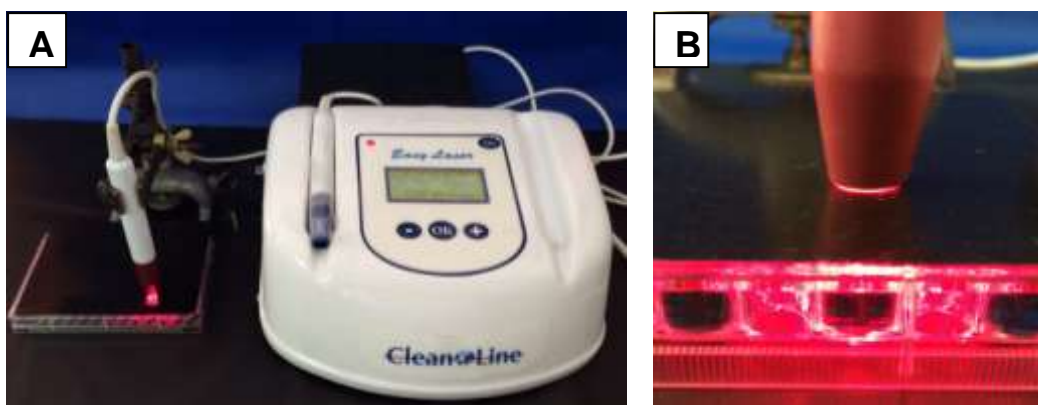


Figura 3 – A) Aplicação da Terapia fotodinâmica (PDT) com laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil), comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), potência de 50 mW e densidade de energia de 15 J/cm² em *A. baumannii in vitro*; B) Uso de anteparo negro-fosco.

Em cada grupo foram realizados 5 ensaios por grupo. Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em ágar MacConkey. Após incubação a 37 °C por 24 h, foi feita a contagem de UFC/mL (Figura 4).

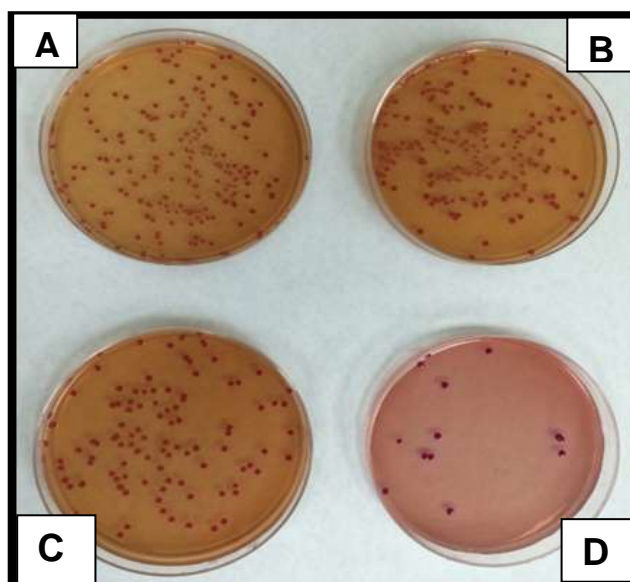


Figura 4 - Estudo *in vitro*: Diluições de *A. baumannii* após ação de PDT semeadas em ágar MacConkey **A**(10⁻³), **B**(10⁻⁴), **C**(10⁻⁵) e **D**(10⁻⁶).

4.4 Estudo *in vivo* da terapia fotodinâmica: Modelo de *G. mellonella*

Todos os experimentos com *Galleria mellonella* foram realizados conforme metodologias descritas por Mylonakis et al. (2005) e Chibebe Junior et al. (2013).

Inicialmente, os parâmetros da PDT *in vivo* tiveram que ser estabelecidos, testando-se a toxicidade do fotossensibilizador e da fonte de luz para *G. mellonella*. As lagartas receberam diferentes concentrações de azul de metileno (variando de 30 a 300 μM) e diferentes densidades de energia do Laser (10, 15 e 20 J/cm^2). Todos os parâmetros testados mantiveram 100% de lagartas vivas até o final do experimento, não apresentando toxicidade para os animais. Assim, foi adotado como parâmetros para a PDT, a concentração de 300 μM de azul de metileno e 20 J/cm^2 de densidade de energia do Laser.

4.4.1 Lagartas de *G. mellonella*

Foram utilizadas lagartas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 250-350 mg, criadas e mantidas no Laboratório de Invertebrados do ICT/UNESP.

A criação se iniciou com a utilização de recipientes plásticos pretos com furos na tampa para receber lagartas em seu último estágio e/ou já pupas, para transformarem em mariposas. Nessa fase os animais não se alimentam e são mantidos em temperatura ambiente. No interior desses recipientes foram colocados pedaços de cartolina azul escuro e um tecido, para transposição dos ovos para cartolina (Figura 5).



Figura 5 - Lagartas no último estágio e/ou já pupas, transformam-se em mariposas, após a copulação formam-se os ovos.

Semanalmente, as cartolinas (azuis) com os ovos são retiradas e transferidas para recipientes plástico (branco) contendo ração e cera, esse pote contendo os ovos é incubado em estufa própria à 28°, e mantido por 20 dias. A ração consiste em 250 g de fubá, 150 g levedura de cerveja, 100 g de farinha de soja, 100 g de leite em pó desnatado, 200 g de mel e 200 g de glicerol, adquiridos no mercado local (Figura 6).

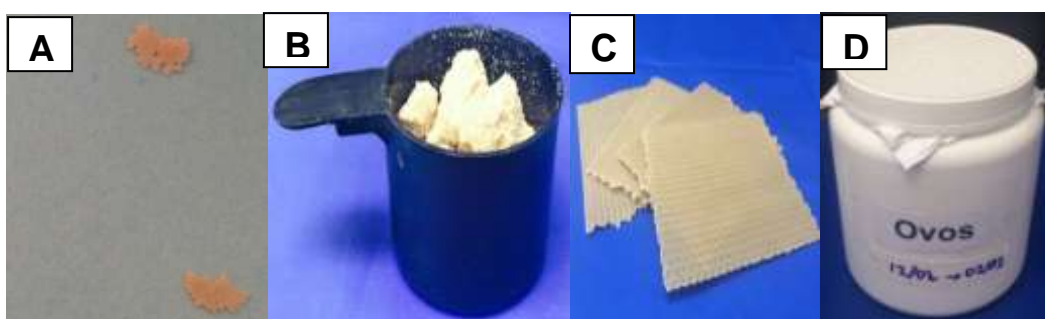


Figura 6 - Incubação dos ovos (A) com ração (B) e cera (C), nos potes brancos (D) em estufa 28 °C, por 20dias, para evolução de ovos para lagartas.

Após 20 dias, quando as lagartas já estão num tamanho que permita ser manuseada (aproximadamente 1 cm), é realizada a limpeza das mesmas, retirando as teias e os casulos, e separando-as de acordo com o tamanho e peso (Figura 7).



Figura 7 - Limpeza e manuseio com as lagartas, prolegue evidenciada na seta.

4.4.2 Preparo das suspensões bacterianas

Suspensões padronizadas das cepas de *A. baumannii* foram preparadas para serem injetadas em *G. mellonella*. Para o preparo dessa suspensão, a cepa do micro-organismo foi semeada em ágar MacConkey (Himedia®) e incubada a 37 °C por 24 h. A seguir, esses micro-organismos foram cultivados em Caldo BHI por 18 h a 37 °C. O crescimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS) esterilizada e centrifugado a 5000 rotação por minuto (rpm) durante 10 min, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido e o sedimento ressuspenso em 5 mL de PBS. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm conforme descrito anteriormente. O número de células a ser injetado foi determinado de acordo com a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por cepas de *A. baumannii*.

4.4.3 Injeção do micro-organismo em *Galleria mellonella*

Um inóculo de 10 μ L da suspensão padronizada de cada cepa foi injetado na hemolinfa de cada lagarta através da última *prolegue* esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 μ L (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz/Switzerland). Em todos os experimentos foi realizado um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante o experimento (Figura 8).



Figura 8 - Material injetado na hemolinfa da lagarta por meio da última *prolegue* esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 μ L.

4.4.4 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *A. baumannii*

Antes do estudo das terapias antimicrobianas sobre a infecção experimental em *G. mellonella*, foi realizada uma análise da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por isolados clínicos de *A. baumannii*. Para isso, foram injetadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas em diferentes concentrações (10^5 a 10^7 células/mL). A seguir, a virulência em *G. mellonella* foi avaliada pela determinação da curva de morte das lagartas de *G. mellonella*.

4.4.5 Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella*

Para determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, após a inoculação do microrganismo, as larvas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica e o número de lagartas de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque (Figura 9).



Figura 9 - Durante curva de sobrevivência, observa-se escurecimento da cutícula após morte por infecção bacteriana.

4.4.6 Estudo de terapias antimicrobianas para o tratamento da infecção experimental em *G. mellonella*

Após determinação do número de células de *A. baumannii* necessárias para causar uma infecção experimental em lagartas de *G. mellonella*, foram realizados os testes para estudar a sensibilidade das infecções à terapia fotodinâmica antimicrobiana, aos antibióticos convencionais, e à terapia combinada de PDT e antibióticos convencionais. Também foram incluídos grupos controle de larvas não

infectadas por *A. baumannii* e tratadas com o fotossensibilizador ou com os antibióticos.

4.4.6.1 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) na infecção experimental em *G. mellonella*

Primeiramente, foram testados vários protocolos de PDT em larvas de *G. mellonella* a fim de selecionar um protocolo para os próximos experimentos, que não apresentasse toxicidade para *G. mellonella*. Então, larvas não infectadas receberam injeção do fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 30 e 300 μM (Figura 10). Para a irradiação luminosa, foram testadas as seguintes densidades de energia: 10, 15 e 20 J/cm^2 (laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio, Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil). A seguir, os efeitos tóxicos do fotossensibilizador ou laser foram avaliados pela curva de sobrevivência, com padronização de 300 μM para todo o experimento, por não apresentar toxicidade ao modelo *in vivo*.



Figura 10 – A) Lagarta sem aplicação; B) Início da Injeção de 10 μL de Azul de Metileno (300 μM); C) Dispersão e escurecimento da cutícula com tonalidade azul; D) Total dispersão do fotossensibilizador.

Após a padronização da concentração do fotossensibilizador e radiação luminosa, as lagartas foram infectadas com cepas de *A. baumannii* resistentes à antibióticos. Decorridos 90 min da

infecção, as lagartas de *G. mellonella* receberam injeção de azul de metileno (10 µL) na última *proleg* direita do inseto. A seguir, as larvas permaneceram 30 min no escuro (tempo pré-irradiação) para proporcionar uma boa dispersão do corante pelo corpo do animal. Então, o laser foi aplicado de acordo com os parâmetros previamente definidos. Após a realização da PDT, as lagartas foram incubadas em estufa a 37 °C para determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*.

4.4.6.2 Tratamento com antibióticos convencionais na infecção experimental em *G. mellonella*

Após 90 min da infecção de *G. mellonella* por *A. baumannii*, os animais foram injetados com 10 µL do antibiótico na última *proleg* direita do inseto. Os antibióticos utilizados, assim como suas respectivas doses foram: Meropenem (20 mg/kg) ou Imipenem (15 mg/kg). Após o tratamento, as lagartas foram incubadas em estufa a 37 °C para determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*.

4.4.6.3 Tratamento combinado de antibióticos convencionais e PDT na infecção experimental em *G. mellonella*

As lagartas receberam terapia fotodinâmica e injeção de antibióticos conforme protocolos descritos anteriormente. Portanto foram realizadas 3 injeções em *G. mellonella*: a primeira foi executada na última *proleg* esquerda para inocular a bactéria, foi utilizado 10 µL de *A. baumannii* na concentração de 10^8 UFC/mL (equivalente a 10^6 UFC/mL inoculado), após essa inoculação foi esperado 90 min para que fosse estabelecida a infecção, a segunda para injetar 10 µL do

fotossensibilizador na concentração de 300 μM esta foi executada na ultima *proleg* direita, as lagartas ficaram no escuro por 30 min para que houvesse dispersão do corante pela hemolinfa, após esse período foi aplicado o laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil), comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), potência de 50 mW e densidade de energia de 15 J/cm^2 por 5 min, imediatamente após foi realizada a terceira injeção para injetar 10 μL do antibiótico, aplicada na penúltima *proleg* esquerda do animal. A seguir, as larvas foram incubadas no escuro em estufa a 37 °C para determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella* e contagem de UFC/mL.

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados de UFC/mL foi realizado Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando-se o Programa Minitab. Em relação aos experimentos de sobrevivência em *G. mellonella*, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel-Cox) utilizando Programa Graph Pad Prism. Foi considerado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Isolados clínicos

Para realização desse trabalho foram utilizados isolados clínicos de *A. baumannii* cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas Valeclin de São José dos Campos. Entre julho de 2014 a fevereiro de 2015 (período de 8 meses), o Laboratório Valeclin deu entrada a 13.715 amostras clínicas suspeitas de estarem ligadas a processos infecciosos provenientes de pacientes hospitalizados. Dessas amostras, 13.426 confirmaram um processo infeccioso, sendo que 207 amostras clínicas foram positivas para *A. baumannii* (1,54%). Entre os isolados clínicos de *A. baumannii*, 58% demonstram resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem por meio do teste de difusão em disco de Kirby & Bauer (CLSI 2915) realizado no próprio Laboratório Valeclin.

Nos ANEXOS A e B contemplam informações sobre os isolados clínicos cedidos pelo laboratório, os quais apresentam resistência aos carbapenêmicos, podendo também ser avaliado o perfil de sensibilidade a outros antibióticos, bem como sítio de isolamento, origem, gênero e idade dos pacientes de onde os micro-organismos foram isolados.

Para realização desse projeto, o Laboratório Valeclin forneceu 21 isolados de *A. baumannii*, sendo 3 isolados sensíveis e 18 resistentes aos antibióticos Imipenem e Meropenem.

5.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, esses isolados foram transferidos para o Laboratório de Microbiologia do ICT/Unesp, onde foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) ao Imipenem e Meropenem (Figura 11), cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

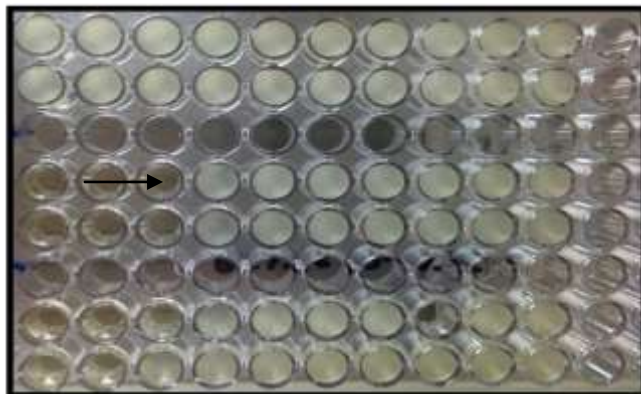


Figura 11 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de *A. baumannii* ao Imipenem, a seta indica a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (64 µg/mL de Imipenem).

Tabela 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima das cepas clínicas de *A. baumannii*

Isolados de <i>A. baumannii</i>	Imipenem (µg/mL)		Meropenem (µg/mL)	
	MIC	Padrão	MIC	Padrão
AS1	1	S	1	S
AS2	<0,5	S	<0,5	S
AS5	1	S	1	S
A1	>128	R	128	R
A2	>128	R	128	R
A3	>128	R	128	R
A4	>128	R	64	R
A5	64	R	64	R
A6	>128	R	128	R
A7	>128	R	64	R
A8	>128	R	128	R
A20	>128	R	128	R
A23	>128	R	64	R
A24	>128	R	64	R
A25	>128	R	64	R
A26	>128	R	128	R
A27	>128	R	>128	R
A28	>128	R	64	R
A31	>128	R	128	R
A32	>128	R	64	R
A33	>128	R	128	R
ATCC	8	I	4	I

Padrão de sensibilidade aos antibióticos: S: Sensível. I: Intermediário e R: Resistente

5.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT)

A seguir, foi realizada a fotossensibilização *in vitro* para verificar a susceptibilidade dos isolados clínicos de *A. baumannii* à terapia

fotodinâmica. Nesse teste foi incluído também uma cepa padrão de *A. baumannii* (ATCC 19606). Inicialmente, a PDT foi realizada sobre 3 isolados sensíveis aos antibióticos (AS-1, AS-2 e AS-5) e 3 isolados resistentes aos antibióticos (A1, A2 e A6). Os resultados obtidos demonstraram que para esses isolados testados, a média de UFC/mL no grupo com terapia fotodinâmica foi inferior aos demais grupos estudados (grupos controle, tratado apenas com laser e tratado apenas com fotossensibilizador). Os resultados de UFC/mL foram convertidos em log para serem analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey, no qual foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle e Tratado com terapia fotodinâmica para os isolados analisados ($p < 0,05$). Os resultados obtidos para a cepa ATCC, isolados clínicos sensíveis e resistentes aos antibióticos estão demonstrados, respectivamente, nas Figuras 12, 13 e 14.

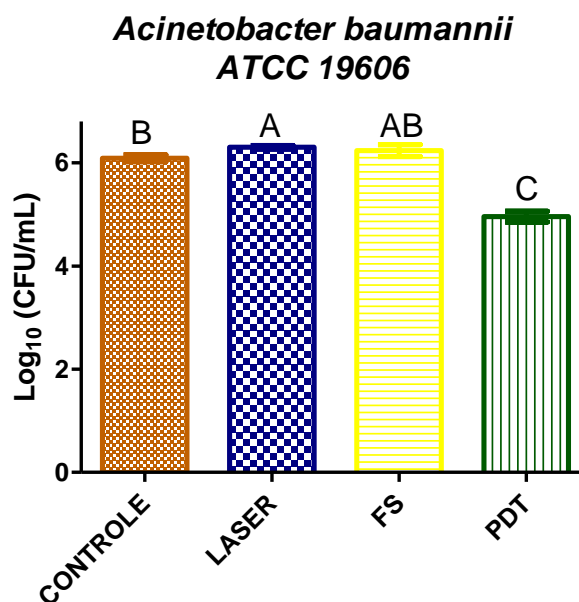


Figura 12 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) da cepa padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com laser e tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

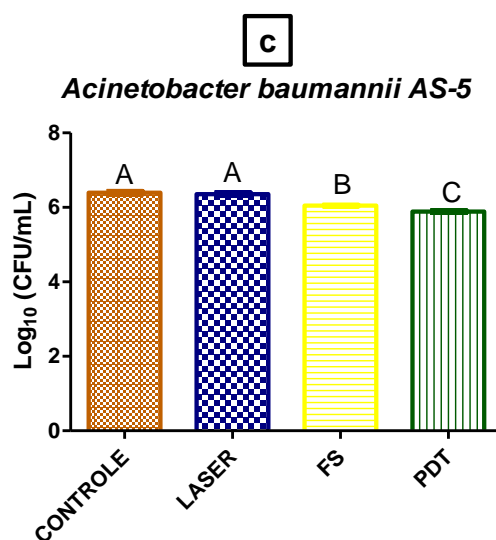
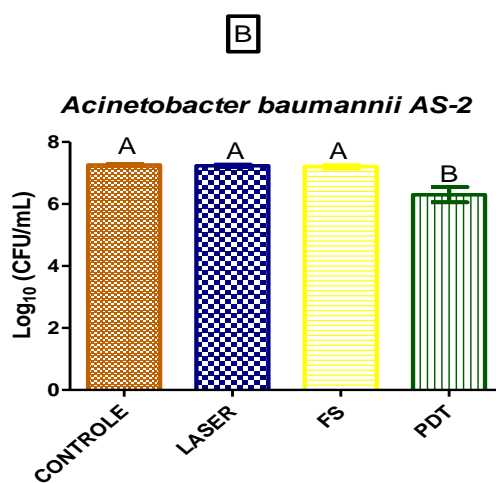
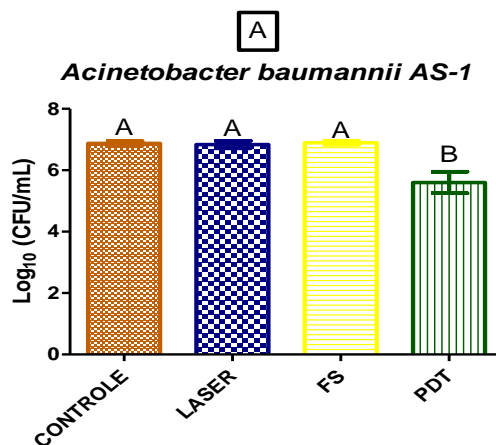


Figura 13 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) dos isolados clínicos de *A. baumannii* sensíveis ao Imipenem e Meropenem para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$), separados em três gráficos A B e C, indicando 3 isolados clínicos diferentes.

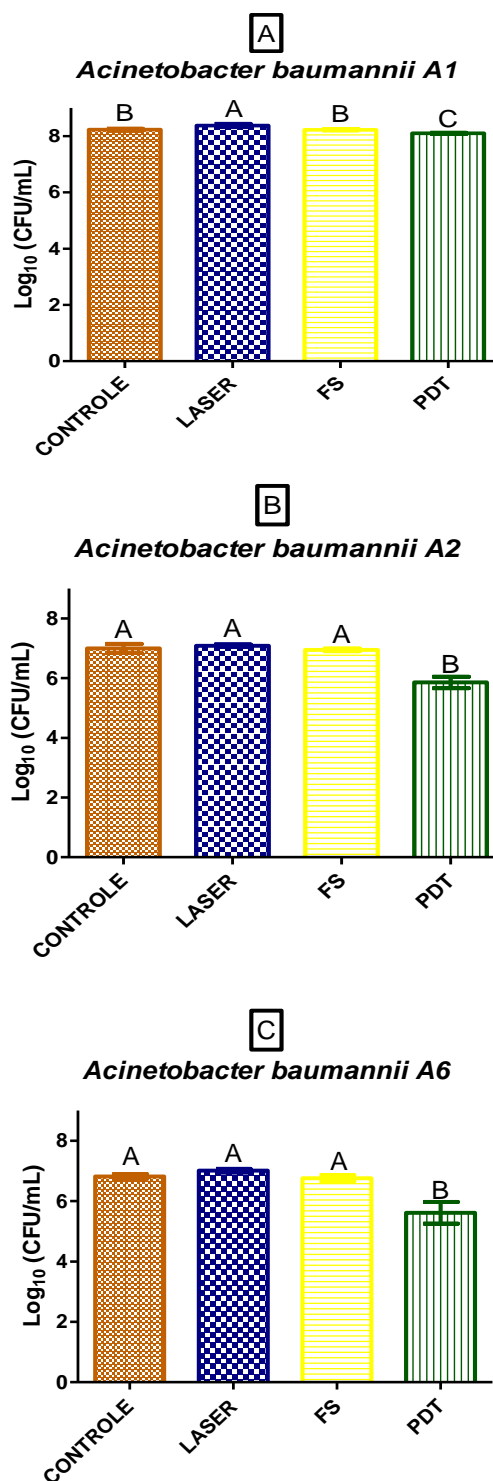


Figura 14 - Médias e desvios-padrão de UFC/mL (Log) dos isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes ao Imipenem e Meropenem para os grupos controle, tratado apenas com laser, tratado apenas com fotossensibilizador e tratado com terapia fotodinâmica (PDT), letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0,05$), separados em três gráficos A B e C, indicando 3 isolados clínicos diferentes.

Visto que entre os 3 isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos antibióticos, todos apresentaram sensibilidade à fotossensibilização *in vitro*, pode-se sugerir que a terapia fotodinâmica tem potencial para auxiliar no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*. Assim mais 15 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram submetidos à fotossensibilização *in vitro*, na qual foram testados apenas dois grupos experimentais: Controle (F-L-), Laser (F-L+), fotossensibilizador (F+L-) e Tratado com terapia fotodinâmica (F+L+).

Para análise e comparação dos resultados obtidos, foi calculado o percentual de redução de UFC/mL dos grupos Tratados com terapia fotodinâmica em relação ao Controle para todos isolados clínicos de *A. baumannii* analisados nesse estudo (1 cepa ATCC, 3 cepas sensíveis aos antibióticos e 18 cepas resistentes aos antibióticos). Os resultados do percentual de redução estão demonstrados nas Figuras 15 e 16, nas quais é possível observar que a PDT reduziu o número de células de *A. baumannii* em todos os isolados testados, mas o percentual de redução foi dependente da cepa analisada.

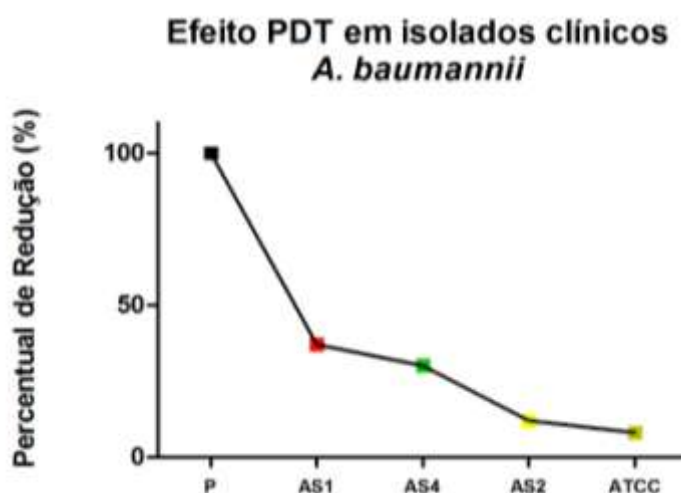


Figura 15 - Percentual de redução (%) de UFC/mL observado nos grupos Controle (P) em relação aos grupos Tratados com PDT para a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e para as 3 isolados sensíveis aos antibióticos Imipenem e Meropenem. P: representa o Grupo controle (L-F-).

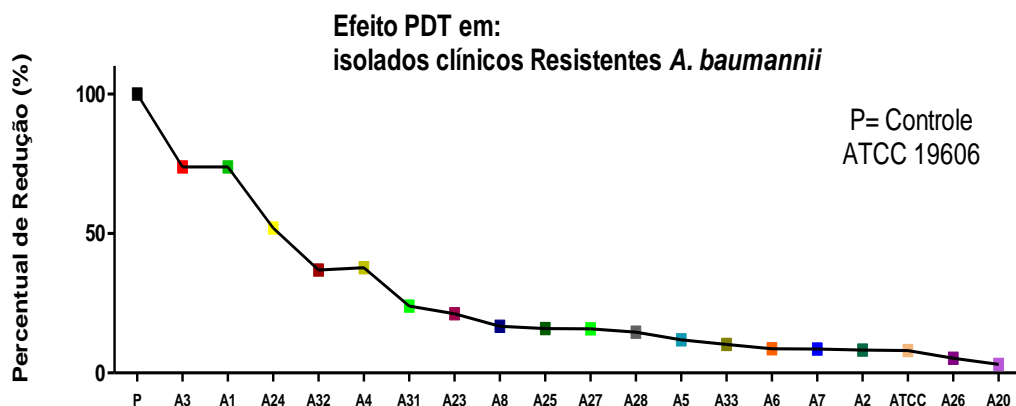


Figura 16 - Percentual de redução (%) de UFC/mL observado nos grupos Controle (P) em relação aos grupos Tratados com PDT para a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e para as 18 isolados resistentes aos antibióticos Imipenem e Meropenem. P: representa o Grupo controle (L-F-).

5.4 Estudo *in vivo*: terapia combinada de PDT e antibióticos na infecção experimental em *Galleria mellonella*

Dando continuidade a proposta desse projeto, o estudo da terapia fotodinâmica sobre *A. baumannii* resistentes aos antibióticos foi estendido para estudo *in vivo*, utilizando *G. mellonella* como modelo de infecção experimental.

Em primeiro lugar, foi necessário testar a susceptibilidade das lagartas de *G. mellonella* à infecção experimental pelas cepas de *A. baumannii*. Assim, a cepa ATCC foi injetada nas larvas em diferentes concentrações (10^5 , 10^6 e 10^7 células/lagarta) e a curva de sobrevivência dos animais foi avaliada, verificando-se que *A. baumannii* na concentração de 10^5 não causou infecção letal em *G. mellonella*. Por outro lado, a concentração de 10^7 levou a 100% de mortalidade dos animais após 24 h da infecção. A concentração de 10^6 matou aproximadamente 60% das larvas até o final do experimento, ou seja, 7 dias (168 h) após a infecção (Figura 17). Portanto a concentração de 10^6 células/larva de *A. baumannii* foi adotada para todos os experimentos subsequentes.

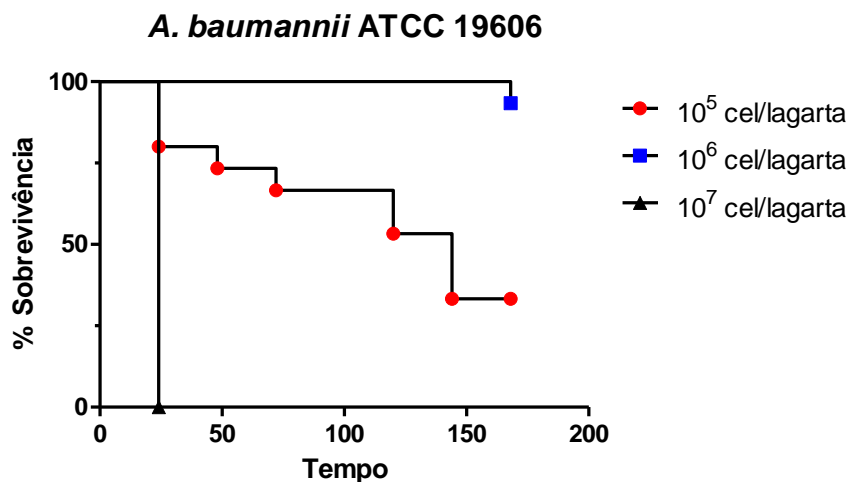


Figura 17 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de *G. mellonella* após a infecção com *A. baumannii* ATCC 19606 nas concentrações de 10^5 , 10^6 e 10^7 células/lagarta.

Após padronização da concentração da suspensão de *A. baumannii* a ser injetada em *G. mellonella*, partimos para o estudo das cepas de *A. baumannii*, sensíveis e resistentes aos antibióticos, em *G. mellonella*. Desse modo, os 3 isolados clínicos sensíveis aos carbapenêmicos (AS1, AS2 e AS4) foram injetados em *G. mellonella*, sendo observado um aumento da sobrevivência das lagartas em um isolado comparado a cepa ATCC (Figura 18). Já para os isolados resistentes (A2, A6, A7 e A26) verificou-se que todos foram mais virulentos do que a cepa ATCC previamente testada (Figura 16).

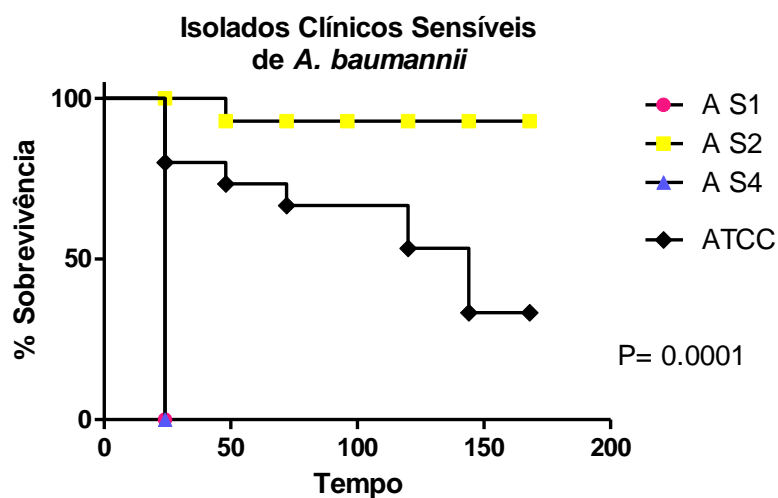


Figura 18 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de *G. mellonella* infectadas por *A. baumannii* (10^6 células/lagartas) cepa ATCC 19606 e isolados sensíveis aos antibióticos Imipenem e Meropenem.

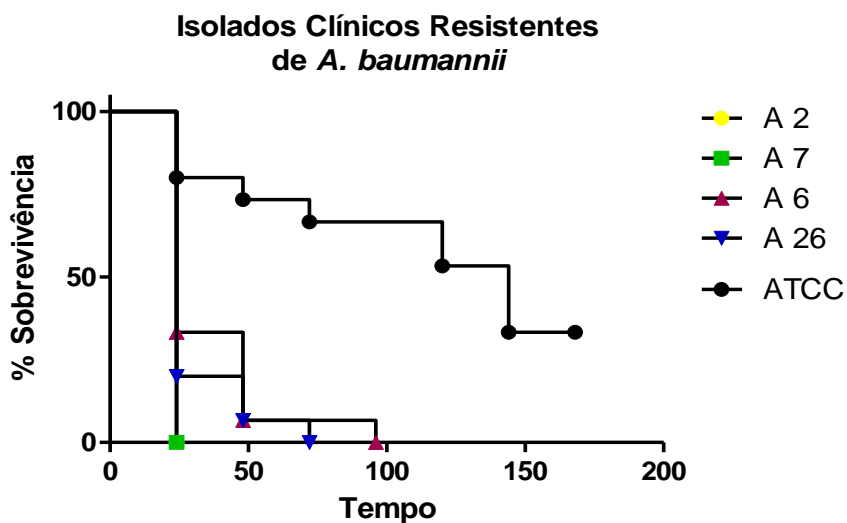


Figura 19 - Curva de sobrevivência (%) das lagartas de *G. mellonella* infectadas por *A. baumannii* (10^6 células/lagartas) cepa ATCC 19606 e isolados resistentes aos antibióticos Imipenem e Meropenem.

Tendo em vista que o isolado de *A. baumannii* A26 foi bastante virulento para *G. mellonella* (Figura 19) e apresentou alta sensibilidade à terapia fotodinâmica *in vitro* (Figura 16), esse isolado foi escolhido para a realização da terapia fotodinâmica *in vivo*.

A seguir, as lagartas de *G. mellonella* foram infectadas com o isolado de *A. baumannii* A26 e tratadas com terapia fotodinâmica nos parâmetros definidos acima. Também foi realizado tratamento com antibiótico (Imipenem ou Meropenem) e tratamento combinado de PDT + antibióticos para estudo do possível sinergismo entre antibióticos e PDT. Os resultados demonstraram que os tratamentos com PDT, antibiótico (Imipenem e Meropenem), e associação de PDT + antibiótico levaram a um discreto aumento na sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, entretanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figuras 20 e 21).

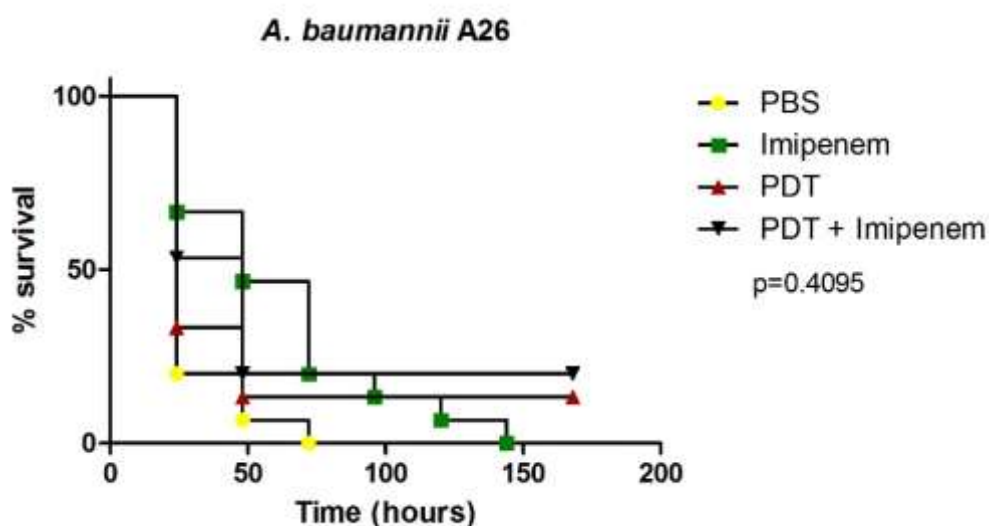


Figura 20 - Curva de sobrevivência das lagartas de *G. mellonella* infectadas por *A. baumannii* resistente à Imipenem e Meropenem (isolado A26). As lagartas infectadas foram tratadas com PBS, PDT, Imipenem ou terapia combinada de PDT + Imipenem.

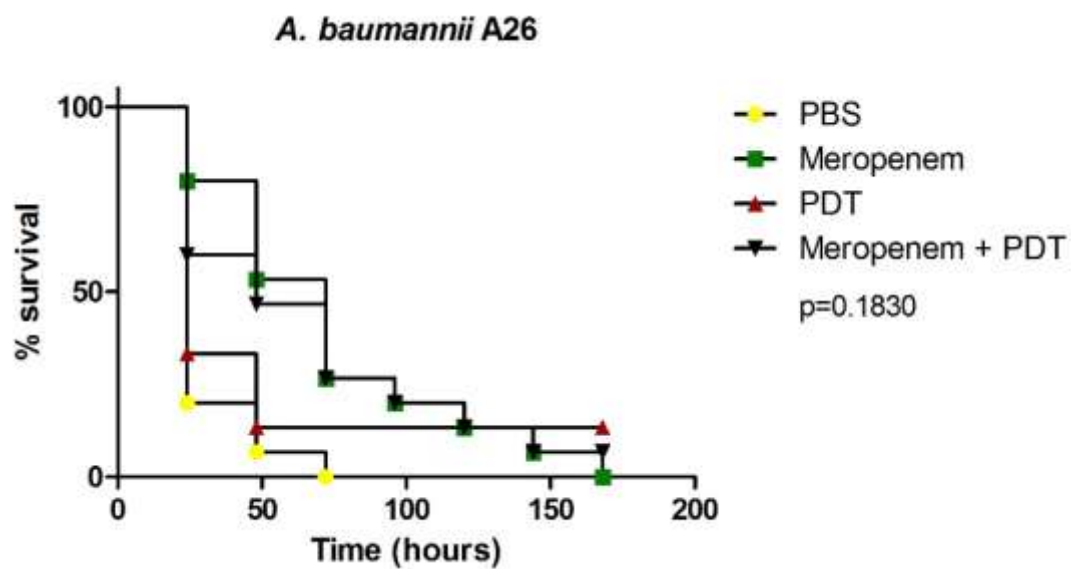


Figura 21 - Curva de sobrevivência das lagartas de *G. mellonella* infectadas por *A. baumannii* resistente à Imipenem e Meropenem (isolado A26). As larvas infectadas foram tratadas com PBS, PDT, Meropenem ou terapia combinada de PDT + Meropenem

6 DISCUSSÃO

Micro-organismos como *A. baumannii* são uma causa morte importante em hospitais principalmente em unidades de terapia intensiva, sua gravidade se dá a fatores de virulência como exopolissacarídeo capsular, produção de β -lactamases (carbapenemases), alterações nas porinas da membrana externa, super-expressão da bomba de efluxo. A diversidade dos fatores de virulência permite *A. baumannii* escapar da resposta imune do hospedeiro bem como da terapia com antibióticos, persistindo assim a infecção (Lemos et al., 2014; Tseng et al., 2009, Prates et al., 2011).

O grande problema de *A. baumannii* nas infecções hospitalares é que esse micro-organismo vem modificando seu perfil de resistência aos antibióticos ao longo dos anos (Perez et al. 2007). Embora os carbapenêmicos sejam considerados antibióticos muito eficazes para infecções causadas por *A. baumannii*, diversos estudos têm relatado o aumento de resistência dessas bactérias aos carbapenêmicos. Kuo et al. (2012) demonstram um crescimento expressivo na resistência das cepas de *A. baumannii* ao antibiótico Imipenem, que em 2002 era de 3,4%, passando para 58,7% em 2010, esses dados concordam com os resultados obtidos nesse trabalho, no qual 58% dos isolados de *A. baumannii* do Laboratório Valeclin apresentaram resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem. Altun et al. (2014) também verificaram expressiva resistência, apontando 86,6% ao Meropenem.

Em pesquisa de dados epidemiológicos do Laboratório cedente dos isolados clínicos, verificamos que *A. baumannii* foi responsável por 1,54% das infecções de pacientes hospitalizados

identificadas no Laboratório Valeclin em um período de 8 meses de observação (2014 a 2015). Utilizando dados epidemiológicos Gaynes, Edwards (2005) analisaram 400.000 isolados clínicos de origem hospitalar registrados no Sistema Nacional de Vigilância Hospitalar Infecções (NNIS) de 1986 a 2003 em Atlanta, Georgia (EUA) e encontram 7% de *A. baumannii* entre isolados identificados nos Laboratórios de Análises Clínicas hospitalares, dados um pouco superiores aos encontrados em nossa pesquisa.

Neste trabalho, as sensibilidades dos isolados clínicos de *A. baumannii* aos antibióticos Imipenem e Meropenem foram comparadas por dois métodos diferentes: difusão em disco e microdiluição em caldo. Os dados apresentados apontaram que os dois métodos foram eficazes para identificar a sensibilidade dos isolados, pois o método de microdiluição em caldo confirmou todos os resultados obtidos no teste de difusão em ágar. Em estudos comparativos de métodos de análise de sensibilidade, Liu et al. (2012) sugerem que o método de difusão em disco, com sua vantagem de baixo custo, pode ser utilizado como substituto ao método padrão ouro, que é o método de microdiluição em caldo, apontando fidedignidade ao método de disco difusão.

A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (PDT) é uma terapia alternativa para controlar micro-organismos patogênicos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos (Sperandio et al., 2013). Infecções por *A. baumannii* multirresistentes representam um problema crescente, especialmente em feridas traumáticas e queimaduras. A PDT tem se mostrado uma alternativa aos agentes antimicrobianos que se mostram ineficazes a classe de micro-organismos multirresistentes, utilizando a combinação de fotossensibilizadores não tóxicos e luz visível (Dai et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Em recente trabalho, Zhang et al. (2014) avaliaram a ação bactericida da PDT sobre *A. baumannii* multirresistente utilizando bioluminescência e também testaram a viabilidade celular em

queratinócitos. Os resultados demonstraram que a taxa média de inativação ao isolado de *A. baumannii* foi 21 vezes maior que a ação sobre os queratinócitos, apontando resultados promissores para utilização *in vivo*, com mínimo efeito lesivo sobre a pele. Ainda nesse trabalho foi utilizado queimaduras de terceiro grau em ratos, com posterior infecção pelo isolado clínico após 30min e observou-se que no grupo tratado com luz, a luminescência bacteriana foi completamente eliminada depois de uma única exposição 55,8 J/cm², já no grupo não tratado o grau de infecção não regrediu, mantendo-se estável (Zhang et al., 2014).

Com o mesmo propósito, de reduzir os níveis bacterianos, no presente trabalho utilizou-se a PDT em isolados clínicos de *A. baumannii* com diferentes sensibilidades aos antimicrobianos oriundos de pacientes hospitalizados. A PDT foi analisada previamente *in vitro*, com posterior análise *in vivo*. Os isolados clínicos de *A. baumannii* sensíveis aos antibióticos Imipenem e Meropenem e a maioria dos isolados resistentes apresentaram sensibilidade significativa à fotossensibilização *in vitro*, confirmando que a PDT é uma técnica promissora com potencial coadjuvante à tratamentos com antibióticos. A PDT reduziu o número de células de *A. baumannii* em todos os isolados testados, mas o percentual de redução foi dependente da cepa analisada, característica essa também encontrada em trabalhos da literatura. Dai et al. (2009) realizaram aplicação tópica de azul de metileno seguido de luz vermelha em queimaduras de pele de rato infectadas por *A. baumannii*. A densidade da potência utilizada foi de 100 mW/cm², os ratos receberam uma exposição à luz total de até 240 J/cm², esses pesquisadores usaram bactérias bioluminescentes, observando redução de luminescência após o tratamento com PDT. Esta terapia induziu uma redução de cerca de 1,8 log₁₀ em luminescência bacteriana da queimadura do rato, enquanto que durante o mesmo período de tempo, foi observada uma redução inferior a 0,9-log₁₀ de luminescência bacteriana para o controle escuro. Pode-se observar também no trabalho destes pesquisadores que quanto mais

imediate a terapia foi aplicada após a infecção, melhor o resultado de redução bacteriana.

Tendo em vista a redução de células bacterianas com utilização de PDT *in vitro*, este trabalho foi estendido para um modelo de infecção *in vivo*. Diversas pesquisas utilizam a lagarta de *G. mellonella* como um modelo *in vivo* para se investigar a virulência de *A. baumannii*, principal espécie a causar infecções hospitalares (Peleg et al., 2009; Gaddy et al., 2012). Estudos prévios indicam que o modelo *G. mellonella* é uma ferramenta poderosa para investigar a virulência de uma variedade de agentes patogênicos bacterianos e fúngicos (Olsen et al., 2011; Desalermos et al., 2012; Chibebe et al., 2013). O sistema imunológico inato de insetos, como *G. mellonella* apresenta um elevado grau de semelhança com os sistemas imunitário de mamíferos, que fazem da *G. mellonella* uma alternativa interessante aos modelos animais para a investigação de patogenicidade infecciosa (Olsen et al., 2011; Desalermos et al., 2012). Citando ainda que plasmócitos e granulócitos foram identificados em *G. mellonella* como tipos de hemócitos que estão envolvidos na fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos, que são elementos importantes na defesa contra bactérias patogênicas.

O uso de *G. mellonella* como modelo *in vivo* tem sido bastante difundido, e se mostra eficaz quando utilizado para analisar a sobrevivência das lagartas infectadas por *A. baumannii*. Hornsey, Wareham (2011) buscando avaliar a ação de antibióticos contra cepas de *A. baumannii*, utilizaram o modelo *in vivo* *G. mellonella*. Esses autores avaliaram a monoterapia e a terapia combinada, usaram os glicopeptídeos, Teicoplanina e/ou Vancomicina associadas a colistina, primeiramente com testes *in vitro*, com posterior sustentação *in vivo*. Os resultados utilizando *G. mellonella* se mostraram significativos, sugerindo como próximo passo o estudo em mamíferos com posterior ensaios clínicos em humanos para análise de farmacocinética e farmacodinâmica.

Chusri et al. (2014) também fizeram uso do modelo *in vivo* de *G. mellonella*, injetando 10 µL de diferentes espécies do gênero *Acinetobacter* sp. ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) na última proleg de cada lagarta, estas foram incubadas a 37 °C durante 6 dias e observadas para a sobrevivência a cada 24 h. Estes autores utilizando o modelo invertebrado com isolados clínicos de diferentes espécies de *Acinetobacter* sp., oriundo de pacientes internados em um único hospital, puderam verificar virulência e sensibilidade a antibióticos dos isolados, podendo concluir que a sobrevivência das lagartas foi dependente das diferenças intrínsecas de virulência dos isolados clínicos de *A. baumannii*, independente de seu perfil de sensibilidade aos antibióticos.

Para esse trabalho inicialmente foi elaborado uma curva de sobrevivência de *G. mellonella* com *A. baumannii* ATCC 19606, indicando que a concentração de 10^6 células/lagarta de *A. baumannii* atingiu 60% de letalidade, sendo adotada para todos os experimentos subsequentes. Seguindo a curva foi realizada a análise de parâmetros para pré-estabelecer a técnica de PDT em *A. baumannii* utilizando *G. mellonella* do ICT/UNESP.

Para PDT *in vivo*, foram testados diferentes parâmetros, como concentração do fotossensibilizador, tempo de infecção, irradiação de energia, utilizando diversos suportes com diferentes maneiras de irradiação, afim de encontrar dados que pudessem viabilizar o restante da pesquisa. Para isso deu-se início, com a análise de sensibilidade das lagartas frente ao fotossensibilizador, avaliando a curva de sobrevivência, onde todos os parâmetros testados mantiveram 100% de lagartas vivas até o final do experimento, não apresentando toxicidade para os animais. Assim, foi adotado como parâmetros para a PDT, a concentração de 300 µM de azul de metileno e 20 J/cm² de densidade de energia do Laser. Cabe destacar que, entre outros pesquisadores cita-se Ragás et al. (2010), baseados em Dai et al. (2009), também avaliando a eficácia da PDT em modelo *in vivo*, utilizaram murino com queimaduras infectadas

por *A. baumannii* multirresistente, neste estudo o azul de metileno foi considerado um bom fotossensibilizador, sob condições de 10 μM , com uma entrega de 30J/cm² com 100mW/cm² conseguiu reduzir até 3 unidades logarítmicas as células bacterianas do tecido infectado. Esses dados incentivaram o presente estudo na escolha do fotossensibilizador.

No presente trabalho obteve-se em estudo *in vitro* uma expressiva redução nos níveis bacterianos, não se observando a mesma intensidade de redução quando esses isolados clínicos foram submetidos a PDT *in vivo*, utilizando *G. mellonella*. Destaca-se que os resultados aqui apresentados ilustram diferentes níveis de virulência entre os isolados, pois a mesma espécie resultou em diferentes curvas de sobrevivência, indicando diferentes mecanismos de virulência utilizados por cada isolado clínico, citando como exemplo o isolado clínico sensível aos carbapenêmicos AS 1, que denotaria pensar que o mesmo sofreria mais ação da PDT e maior sobrevivência do modelo *in vivo*, foi o que apresentou maior virulência, eliminando todas as lagartas infectadas por ele em menos de 24h após inoculação e o isolado clínico não sofreu ação após aplicação da terapia fotodinâmica.

Esse fato é compreensível quando nos deparamos com trabalhos como o de Chusri et al. (2014) que na busca por compreender a virulência e mecanismos de resistência do gênero *Acinetobacter* sp., comparando cepas de *A. baumannii* sensível e cepas resistentes aos carbapenêmicos, utilizando *G. mellonella*, atestam não ter sido observada diferença estatística significativa na sobrevivência entre as lagartas infectadas com cepas resistentes ou sensíveis aos carbapenêmicos. No estudo destes autores foi avaliado a sobrevivência das lagartas entre espécies diferentes e puderam observar que houve maior sobrevivência das lagartas quando estas foram infectadas com cepas de *Acinetobacter* “não” *baumannii*, como *A. nosocomialis* e *A. pittii*, e menor sobrevivência das larvas quando infectadas por *A. baumannii* sensível ou resistente aos carbapenêmicos (Chusri et al., 2014).

Quando se analisa vários isolados clínicos de uma espécie os quais apresentam diferentes resultados de uma mesma técnica, isso fortalece a compreensão da variedade de mecanismos de virulência deste micro-organismo e o quão importante é o diagnóstico genômico desta espécie, para que não se incida em estarmos lidando com cepas mutantes que após o contato com antibióticos apresente resistência, ou seja, inicialmente apresenta-se sensível a uma gama de medicamentos, mas *in vivo* apresenta capacidade de adquirir resistência. Cabe ressaltar que recentemente uma nova enzima foi encontrada a *Nova Deli metallo- β -lactamase 1*, que faz com que algumas bactérias que já são resistentes a carbapenêmicos ampliem ainda mais essa resistência (Zhang et al., 2014)

Autores como Chibebe Júnior et al. (2013) também utilizaram lagartas de *G. mellonella* infectadas por bactérias utilizando a terapia fotodinâmica antimicrobiana (isolada ou em associação com antibióticos), podemos observar que o tratamento das larvas com terapia fotodinâmica, mediada por azul de metileno, prolongou a sobrevivência das lagartas infectadas com *E. faecium*. Estes autores também verificaram que o tratamento associado de PDT e vancomicina resultaram em um aumento significativo da sobrevivência das larvas quando comparado ao tratamento isolado de PDT ou ao tratamento isolado de vancomicina. Esses dados sugeriram que a PDT tornou a cepa de *E. faecium* resistente à vancomicina mais susceptível a esse antibiótico, possivelmente a permeabilização da parede celular bacteriana provocada pela PDT pode ter facilitado a entrada da vancomicina no interior da célula de *E. faecium*.

Utilizando-se dos mesmos parâmetros de PDT do trabalho de Chibebe et al. (2013) nesse estudo, a PDT e o tratamento combinado de PDT com antibióticos (Imipenem ou Meropenem) não demonstraram efeitos significativos na sobrevivência das lagartas infectadas por cepa de *A. baumannii* resistente aos antibióticos, sugerindo

que as infecções por bactérias Gram-negativas são mais difíceis de serem tratadas pela PDT do que infecções por bactérias Gram-positivas.

Bactérias Gram negativas são extremamente tóxicas pela liberação de LPS (lipopolissacarídeo), isso pode explicar que as lagartas poderiam estar morrendo em função do choque tóxico produzido pelo LPS, quando esta teria sofrido a ação da PDT. A PDT pode ter matado as bactérias, mas o LPS pode ter continuado ativo levando a morte dos animais, para tal esclarecimento estudos futuros devem realizar a cultura da hemolinfa contendo o micro-organismo, antes e depois da aplicação de PDT.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

- a) a PDT *in vitro* reduziu o número de células de *A. baumannii* em todos os isolados testados, mas o percentual de redução variou conforme o isolado clínico estudado;
- b) no modelo hospedeiro de *G. mellonella*, a PDT e o tratamento combinado de PDT com antibióticos (imipenem e meropenem) não demonstraram efeitos significativos na sobrevivência dentro desse estudo das lagartas infectadas por cepas de *A. baumannii* resistente aos antibióticos.

8 REFERÊNCIAS*

Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*. 2011 May;79(6):2277-84.

Altun HU, Yagci S, Bulut C, Sahin H, Kinikli S, Adiloglu AK, et al. Antimicrobial Susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates with different genotypes. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Dec;7;7(12):e13347.

Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect*. 2007 May;9(6):729-34.

Asencio MA, Carranza R, Huertas M. Resistencia a antimicrobianos de los microorganismos más frecuentemente aislados en el Hospital General La Mancha Centro entre junio de 2009 y mayo de 2010. *Rev Esp Quimioter*. 2012 Sep;25(3):183-8.

Castano APDT, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004 Dec;1:279–93. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4

Champion OL, Cooper IA, James SL, Ford D, Karlyshev A, Wren BW, et al. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*. 2009 May;155(Pt 5):1516-22.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AOC, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One*. 2013;8(2):e55926. doi: 10.1371/journal.pone.0055926

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 ago; citado em 26 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chibebe Júnior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol.* 2013 Oct;13(1):217. doi: 10.1186/1471-2180-13-217

Chusri S , Chongsuvivatwong V, Rivera JI , Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul;58(7):4172-9. doi: 10.1128/AAC.02992-14

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard [CLSI document M7 A09]. 9th ed. CLSI document M7-A9, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M100-S23]. 23th ed., Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Jul;114(1): 67-74. doi: 10.1016/j.oooo.2012.02.002

Dai T, Tegos GP, Lu Z, Huang L, Zhiyentayev T, Franklin MJ, et al. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):3929-34.

Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS pathogens.* 2012 Feb;8(2):e1002451. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451

Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of anti staphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Aug; 66(8):1785-90. doi: 10.1093/jac/dkr198

Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials.* 2009 Jun;30(18):3158-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.038

Doan TN, Kong DC, Marshall C, Kirkpatrick CM, McBryde ES. Characterising the transmission dynamics of *Acinetobacter baumannii* in

Intensive Care Units Using Hidden Markov Models. PLoS One. 2015;10(7): e0132037 doi: 10.1371/journal.pone.0132037

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011 Mar; 54(2):123-30 doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microbes Infection. 2010 Jun;12(6):488-96.

Fuchs BB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Aug;51(8):2929-36.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of Acinetobactin-Mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect Immun. 2012 Mar;80(3):1015-24. doi: 10.1128/IAI.06279-11

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Aug;73(4):354-60. doi: 10.1016/j.diagmicrobio

Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2005 Sep;41(6):848-54.

Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res. 2014 Feb;13(2):460-76 doi: 10.1021/pr400603f

Hornsey M, Wareham DW. In Vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3534–3537. doi: 10.1128/AAC.00230-11

Hashimoto MC, Prates RA, Kato IT, Núñez SC, Courrol LC, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study. Photochem Photobiol. 2012 Jun;88(3):590-5. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01137

Huang YY, Tanaka M, Vecchio D, Garcia-Diaz M, Chang J, Morimoto Y, et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012 Jul;8(5):479-94. doi: 10.1586/eci.12.37

Insua JL, Llobet E, Moranta D, Pérez-Gutiérrez C, Tomás A, Garmendia J, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun*. 2013 Oct;81(10):3552-65. doi: 10.1128/IAI.00391-13

Izadpanah M, Khalili H. Antibiotic regimens for treatment of infections due to multidrug-resistant Gram-negative pathogens: An evidence-based literature review. *J Res Pharm Pract*. 2015 Jul;4(3):105-114. doi: 10.4103/2279-042X.162360

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*. 2000 Jul;182(13):3843-5.

Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter* [review]. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Nov;11(11):868-73.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011 Nov;4(11):247.

Junqueira JC, Martins S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009 Nov;24(6):877-84. doi: 10.1007/s10103-009-0673-4.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens [review]. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004 Feb;28(1):101-12.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications [review]. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43(7):755-67. doi: 10.1002/lsm.21080

Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J*. 2014 Aug;50(2):37-44. doi: 10.4068/cmj.2014.50.2.37

Kuo SC, Chang SC, Wang HY, Lai JF, Chen PC, Shiao YR, et al. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*

complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis.* 2012 Aug;12:200. doi: 10.1186/1471-2334-12-200

Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2014 Aug;27:1-17. [Epub ahead of print]

Lebreton F, Le Bras F, Reffuveille F, Ladjouzi R, Giard JC, Leclercq R, et al. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2011;21(3-4):191-6. doi: 10.1159/000332737

Lemos EV, la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2014 May;20(5):416-23. doi: 10.1111/1469-0691.12363

Liu JW, Ko WC, Huang CH, Liao CH, Lu CT, Chuang YC, et al. Agreement assessment of tigecycline susceptibilities determined by the disk diffusion and broth microdilution methods among commonly encountered resistant bacterial isolates: results from the tigecycline *in vitro* surveillance in taiwan (TIST) Study, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1414–7. doi: 10.1128/AAC.05879-11.

Lutz L, Pereira DC, Paiva RM, Zavascki AP, Barth AL. Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. *BMC Microbiol.* 2012 Sep;12:196. doi: 10.1186/1471-2180-12-196

Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J, Felgenträger A, Bäumler W, Landthaler M, et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011 May; 9(5):360-6. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x

Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod Oral Radiol.* 2011 Jan;111(1):71-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.08.012

Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of

Enterococcus faecalis. Infect Immun. 2011 Nov;79(7):2638-45. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02390.x

Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109:392-401. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.10.006

Miyabe M, Junqueira JC, Costa AC, Jorge AO, Ribeiro MS, Feist IS. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus spp*. Braz Oral Res. 2011 May-June; 25(3):230-4.

Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun. 2003 May;71(5):2404-13.

Moisoiu A, Ionitã M, Sârbu L, Stoica C, Grigoriu L. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens in the "Marius Nasta" Pneumology Institute, Bucharest. Pneumologia. 2014 Apr-Jun;63(2):109-11.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect Immun. 2005 Jul;73(7):3842-50.

Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). Virulence. 2011 Mar-Apr;2(2):111-9.

Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr., Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2605-9. doi: 10.1128/AAC.01533-08

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2011 May;26(3):341-8. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Oct;51(10):3471-84.

Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GT, Hamblin MR. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2011 Jul;66:1525-32.

Rafei R, Pailhoriès H, Hamze M, Eveillard M, Mallat H, Dabboussi F, et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Tripoli, Lebanon using bla(OXA-51-like) sequence based typing. BMC Microbiol. 2015 May 16;15:103. doi: 10.1186/s12866-015-0441-5

Ragàs X, Dai T, Tegos GP, Agut M, Nonell S, Hamblin MR. Photodynamic Inactivation of *Acinetobacter baumannii* Using Phenothiazinium Dyes: In Vitro and *In Vivo* Studies. Lasers Surg Med. 2010;42(5):384-90. doi: 10.1002/lsm.20922

Rossoni RD, Junqueira JC, Santos ELS, Costa ACB, Jorge AOC. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosine in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. Lasers Med Sci. 2010; 25:581-6. doi: 10.1007/s10103-010-0765-1

Russo TA, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Cox AD, St Michael F, et al. The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization. Infect Immun. 2013 Mar;81(3):915-22. doi: 10.1128/IAI.01184-12

Sharma SK, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes *in vivo*: reality or a dream? Nanomedicine (Lond). 2011a; 6(10):1813-25. doi: 10.2217/nnm.11.144

Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, Huang YY, Huang L, De Arce VJ. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models [Review]. Curr Pharm Des. 2011b;17(13):1303-19. Review.

Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006 Apr;83(1):34-8.

Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2013 Feb;8(2):108-20.

Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Sep;52(9):3202-9. doi: 10.1128/AAC.00006-08.

Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue- mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):155-60.

Tien N, You BJ, Chang HL, Lin HS, Lee CY, Chung TC, et al. Comparison of genospecies and antimicrobial resistance profiles of isolates in the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex from various clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec; 56(12):6267-71. doi: 10.1128/AAC.01304-12.

Tseng SP, Teng LJ, Chen CT, Lo TH, Hung WC, Chen HJ, et al. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med.* 2009;41(5):391-7. doi: 10.1002/lsm.20765

Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56(9):4856-61. doi: 10.1128/AAC.05996-11

Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Winter JS, Santos RP, Azambuja AZ, Cechinel AB, Goldani LZ. Microbiologic isolates and risk factors associated with antimicrobial resistance in patients admitted to the intensive care unit in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control.* 2013 Sep;41(9):846-8. doi: 10.1016/j.ajic.2012.11.010

Yasmin A, Kenny JG, Shankar J, Darby AC, Hall N, Edwards C, et al. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(4):1122-30. doi: 10.1128/JB.01293-09

Zhang Y, Zhu Y, Gupta A, Huang Y, Murray CK, Vrahas MS, et al. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. *J Infect Dis.* 2014 Jun; 15;209(12):1963-71. doi: 10.1093/infdis/jit842

Zorgani A, Abofayed A, Gliba A, Albarbar A, Hanish S. Prevalence of Device-associated Nosocomial Infections Caused By Gram-negative Bacteria in a Trauma Intensive Care Unit in Libya. *Oman Med J.* 2015 Jul; 30(4):270-5. doi: 10.5001/omj.2015.54

ANEXO A - Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *A. baumannii*, realizado no Laboratório Valeclin, pelo método de disco difusão

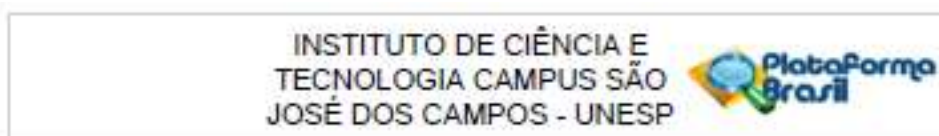
Classe	AS1	AS2	AS5	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A23	A20	A24	A25	A26	A27	A28	A31	A32	A33
Antibióticos	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aminoglicosídeo																					
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Tobramicina	S	S	S	N	R	R	R	S	S	S	S	S	N	R	R	R	R	R	R	R	R
Amp.+Subl.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Piper.+Tazob.	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Doxiciclina	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	R	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	R	S	S	S
3 Cefotaxima	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3 Ceftazidima	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4 Cefepime	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Carbapenicos																					
Imipenen	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Meropenen	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fluoroquinol																					
Ciprofloxacino	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sulfonamidas																					
Sulfazotrin	S	S	S	N	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	N	R
Quinolonas																					
Levofloxacino	S	S	S	N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	R

Padrão de sensibilidade aos antibióticos: S: Sensível e R: Resistente I: Intermediário N: Não testado

ANEXO B - Caracterização dos isolados clínicos de *A. baumannii* cedidos pelo laboratório Valeclin

Isolados de <i>A. baumannii</i>	Material	Origem do material	Idade (anos)	Gênero
A1	Secreção Extenoectomia	H.Santa Casa	50	Masculino
A2	Secreção Sacra	H. Santa Casa	64	Masculino
A3	Aspirado Traqueal	UTI Santa Casa	65	Feminino
A4	Secreção Traqueal	UTI Santa Casa	47	Masculino
A5	Aspirado Traqueal	UTI Santa Casa	77	Feminino
A6	Aspirado Traqueal	UTI Santa Casa	81	Masculino
A7	Secreção Traqueal	UTI Santa Casa	57	Masculino
A8	Secreção do Reto	UTI Santa Casa	59	Masculino
A9	Secreção de axila	LabClin	59	Masculino
A10	Diversos	UTI Santa Casa	76	Feminino
A11	Secreção Traqueal	UTI Santa Casa	48	Feminino
A12	Secreção Memb. Inferior	Santa Casa Queimados	69	Masculino
A13	Tronco	Santa Casa Queimados	59	Masculino
A14	Secreção de Reto	H.Santa Casa	75	Masculino
A15	Cateter occipital	UTI Santa Casa	65	Masculino
A18	Secreção Traqueal	UTI Santa Casa	53	Feminino
A19	Sangue	UTI Santa Casa	57	Feminino
A20	Urina	UTI Santa Casa	93	Feminino
A21	Líquido Intra abdominal	LabClin	45	Feminino
A22	Secreção Coxa/Dorso	Santa Casa Queimados	20	Feminino
A23	Swab Reto	Labclin	31	Feminino
A24	Secreção Sacra	UTI Santa Casa	51	Feminino
A26	Secreção Traqueal	UTI Santa Casa	40	Masculino
Isolados de <i>A. baumannii</i>	Material	Origem do material	Idade (anos)	Gênero
A27	Secreção de ferida	UTI/ Geral São José	51	Feminino
A28	Secreção Pleurostomia	UTI/ Geral São José	76	Masculino
A29	Secreção Ferida/ coxa	Santa Casa Queimados	69	Masculino
A30	Secreção Traqueal	H.Santa Casa	53	Masculino

ANEXO C - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS E TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES

Pesquisador: Mirian Marcolan de Mello

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24409813.9.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 496.097

Data da Relatoria: 10/12/2013

Aprezentação do Projeto:

Devido à rápida expansão dos micro-organismos resistentes aos antibióticos e ao desenvolvimento limitado de novos agentes antimicrobianos, as infecções por bactérias Gram-negativas estão se tornando um desafio para os profissionais da saúde e uma ameaça para a saúde pública internacional. O objetivo desse estudo será avaliar o efeito sinérgico dos antibióticos convencionais associados à terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) no controle de bactérias Gram-negativas multiresistentes, utilizando o modelo de infecção experimental em *Galleria mellonella*. Para realização desse trabalho, serão obtidas cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* dos Laboratórios de Análises Clínicas da cidade de São José dos Campos/SP. Todas as cepas clínicas serão submetidas aos testes para determinação da Concentração Inibitória Mínima aos antibióticos Imipenem, Meropenem e Ciprofloxacina seguindo as normas CLSI. Cepas sensíveis e resistentes aos antibióticos serão avaliadas quanto à sensibilidade *in vitro* à terapia fotodinâmica antimicrobiana. Além disso, serão testados os efeitos dos antibióticos convencionais, da PDT e da terapia combinada de antibióticos e PDT nas infecções experimentais induzidas em *G. mellonella* por isolados clínicos de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* resistentes aos antibióticos. Os resultados das terapias na infecção experimental

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dirceu CEP: 12245-000
 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
 Telefone: (12)3947-0078 Fax: (12)3947-0010 E-mail: cep@focj.unesp.br

Continuação do Protocolo: 498/07

serão avaliados por meio da curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* e contagem de UFC/mL de bactérias presentes na hemolinfa dos animais. Os dados dos testes *in vitro* e da contagem de UFC/mL em *G. mellonella* serão submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* serão analisados pelo método de Log-rank. Em todos os testes, será considerado nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A busca por novas terapias que possam destruir os microrganismos sem induzir o aparecimento de cepas resistentes indesejáveis se faz necessário e também de extrema urgência, pois o arsenal de antibióticos preconizados seguros ao indivíduo, contra os microrganismos intitulados como multiresistente, tem se tomado restrito. Frente a esse panorama surge a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT), a qual sugere vantagens sobre a terapia antibiótica tradicional, pois propõem agregar seu potencial, melhorando a condição bactericida dos antibióticos já empregados na terapia convencional.

Objetivo Primário:

O objetivo desse estudo será avaliar uma nova abordagem no controle de bactérias Gram-negativas multiresistentes, utilizando antimicrobianos convencionais associados à terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) para o tratamento de infecção experimental em modelo invertebrado de *G. mellonella*.

Objetivo Secundário:

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos convencionais para isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*; - Avaliar a ação da PDT sobre culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, comparando isolados sensíveis e resistentes aos antibióticos em relação a sensibilidade à PDT; - Testar a ação dos antibióticos convencionais, da PDT e da terapia combinada de antibióticos e PDT nas infecções experimentais induzidas em *G. mellonella* por isolados clínicos de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* resistentes aos antibióticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimes CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3547-0078 Fax: (12)3547-0010 E-mail: cep@fojc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Contribuição do Financiador: 496.067

Não existe risco aos seres humanos participantes da pesquisa, pois serão trabalhadas com cepas de microrganismo que foram identificadas dos seres humanos, por meio de análise com posterior identificação de seus materiais biológicos, estas cepas de microrganismo não retornarão aos pacientes, daremos seguimento com análises laboratoriais *in vitro*, utilizando para a análise *in vitro* o invertebrado *Galleria mellonella*.

Benefícios:

A abordagem e pesquisa desta terapia alternativa aliada a convencional irá permitir o entendimento de propriedades de microrganismos de interesse hospitalar, os quais estão presentes em infecções localizadas de baixo risco, que devido sua virulência e ausência de sensibilidade aos antibióticos, evoluem rapidamente para infecções sistêmicas com alto índice de letalidade. Utilizando para essa interação um modelo hospedeiro de infecção experimental invertebrado, a *G. Mellonella*, com ampla e promissora utilização no campo de pesquisa que requerem características de processos infecciosos em hospedeiro vivo, apresentando vantagens de utilização quando comparada com modelos de vertebrados, auxiliando na descoberta de novas estratégias terapêuticas para as infecções humanas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico na área da medicina levou ao desenvolvimento de equipamentos de diagnósticos de alta precisão, procedimentos cirúrgicos mais avançados e a descoberta de novos medicamentos, acontecimentos esses que marcaram o aumento da sobrevivência e expectativa de vida da população mundial. Em contrapartida, esses avanços tecnológicos se depararam com o aumento do número de mortes causadas por bactérias multirresistentes (Asencio et al. 2012, Lutz L et al 2012). Todos esses aditivos de novas tecnologias tomam-se inexpressivos quando um paciente apresenta uma infecção por bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis para tratamento das infecções. O desenvolvimento de resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos contribuem significativamente para as infecções hospitalares.

Os micro-organismos encontram nos pacientes hospitalizados um ambiente de extrema facilidade para sua multiplicação e desenvolvimento dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Walsh et al. 2004). As características dos pacientes internados, principalmente os que estão em Unidades de Terapia Intensiva, preenchem os requisitos necessários para colonização e multiplicação de micro-organismos patogênicos, como a vulnerabilidade imunológica e o desequilíbrio da microbiota residente. Além disso, esses pacientes são frequentemente

Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimes CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-0078 Fax: (12)3947-8010 E-mail: ceph@foajc.unesp.br

Continuação do Parecer: 496.097

submetidos a várias exposições aos antimicrobianos, muitas vezes atribuídas aos episódios de infecções recorrentes e internações anteriores (Winter et al. 2013). Segundo Winter et al. (2013), 58% dos pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas de PortoAlegre/Brasil e infectados por bactérias multirresistentes foram à óbito após quatro semanas do início da infecção. As principais bactérias que escapam ao alcance dos antibióticos disponíveis atualmente, foram denominadas por Rice et al. (2008) como grupo "ESKAPE" (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp.). Entre esses micro-organismos, destacam-se as bactérias Gram-negativas, que são caracterizadas pela presença de uma membrana externa que limita a penetração de vários antibióticos. Grande parte das infecções hospitalares tem sido atribuída às seguintes espécies de bactérias Gram-negativas: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Vidallic et al. 2012). Gales et al. (2012) caracterizaram o perfil dos micro-organismos responsáveis por infecções hospitalares, utilizando como base de dados o Programa Centro de Vigilância Antimicrobiana da América Latina, no período de 2008 a 2010. Foram consultados mais de 5.000 isolados clínicos, nos quais *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* ficaram entre as principais espécies de micro-organismos envolvidas nos casos de infecções da corrente sanguínea, pneumonia, e infecções de pele ou tecidos moles. Em infecções da corrente sanguínea, *Klebsiella* spp. foi o terceiro micro-organismo mais prevalente (12,3%), seguido por *Pseudomonas* spp. (7,5%) e *Acinetobacter* spp. (7,2%). Já nos casos de pneumonia, *Pseudomonas aeruginosa* foi a espécie de maior prevalência (31,2%), aparecendo *Acinetobacter* spp. em terceiro lugar (17,7%) seguido por *Klebsiella* spp. (10,2%). Nas infecções de pele, *Pseudomonas* spp. recebeu o terceiro lugar (13,8%), seguida por *Klebsiella* spp. (10,4%) e *Acinetobacter* spp. (9,9%). Em relação aos micro-organismos *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter baumannii* é a espécie mais comumente encontrada em amostras clínicas humanas e também a maior responsável por infecções adquiridas em hospitais. Essa espécie consiste em cocobacilos Gram-negativos imóveis, oxidase negativa e classificada na família Moraxellaceae e no gênero *Acinetobacter*. As espécies de *Acinetobacter* tendem a ser resistentes a uma gama de antibióticos, inclusive sua resistência à penicilina pode servir como prova de identificação microbiana (Winn et al., 2008). Tien et al. (2012) demonstraram o crescente desenvolvimento de resistência de *A. baumannii* aos agentes antimicrobianos de última geração que estão disponíveis para tratamento clínico. Esses autores compararam percentuais de cepas resistentes ao longo dos anos, e verificaram que, em Taiwan, no ano 2000 a resistência ao antimicrobiano Imipenem era de 22%, passando para 57% em 2006. Já os dados de 2008, revelaram que 65 e 68% das cepas de *A. baumannii* apresentavam resistência respectivamente, aos

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-0078 Fax: (12)3947-0010 E-mail: ceph@focjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 496.097

antibióticos Imipenem e Meropenem.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa dispensa o uso do TCLE por ser realizada in vitro com material biológico doado por laboratórios do município.

Recomendações:

Avaliamos que a pesquisa tem relevância, podendo contribuir no tratamento de bactérias multiresistentes, mas como nossa atribuição é avaliar os diversos aspectos da sua realização, nos preocupamos também com todas as etapas do processo. O pesquisador foi claro e detalhado na fundamentação e metodologia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendendo à solicitação do colegiado o pesquisador encaminhou a autorização do Laboratório ValeCln.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do relator

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 16 de Dezembro de 2013

Assinador por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9076 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@fajc.unesp.br