

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Mariana Leyser

**AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES DE *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Porto Alegre

2020

Mariana Leyser

**AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES DE *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Dias de Oliveira

PORTO ALEGRE

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Leyser, Mariana
Avaliação da Erradicação de Biofilmes de
Acinetobacter calcoaceticus-baumannii / Mariana
Leyser. -- 2020.
56 f.
Orientadora: Sílvia Dias de Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Microbiologia. 2. Resistência bacteriana. 3.
Biofilme. 4. Acinetobacter calcoaceticus-baumannii. I.
Oliveira, Sílvia Dias de, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mariana Leyser

**AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES DE *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharela em Biomedicina

Aprovado em: 16 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Ana Paula Guedes Frazzon - UFRGS

Rafael Schneider- UFRGS

Sílvia Dias de Oliveira - PUCRS (orientadora)

RESUMO

Cada vez mais se observa a prevalência de resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de diversas amostras hospitalares. Membros do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) resistentes a antimicrobianos estão entre os principais microrganismos causadores de infecções relacionadas à assistência em saúde em todo o mundo. A permanência no ambiente e a dificuldade de tratamento são especialmente agravadas pela sua capacidade de formar biofilme, visto que a presença do biofilme pode dificultar a ação de antibióticos e de outros agentes antimicrobianos. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade dos antimicrobianos tobramicina e polimixina B em erradicar biofilmes formados por isolados hospitalares de ACB. Para isso, foram utilizados 19 isolados de ACB oriundos de amostras clínicas. A capacidade destes isolados em formar biofilme, bem como a suscetibilidade de cultivos planctônicos à tobramicina e à polimixina B, foram analisadas. Os isolados foram cultivados por 48 h em microplacas na condição de biofilmes. Após este período, a concentração mínima para erradicação de biofilme (CMEB) foi avaliada empregando os fármacos tobramicina e polimixina B, expondo a concentrações de polimixina B, que variaram de 1 a 32 µg/mL, e concentrações de tobramicina de 2 a 256 µg/mL. Foi observado que a concentração de polimixina B necessária para erradicar biofilme de ACB em todos os isolados analisados foi superior a 32 µg/mL, enquanto ao avaliar a tobramicina, dois isolados apresentaram a CMEB de 256 µg/mL, e o restante apresentou concentração superior a 256 µg/mL. A intensidade dos biofilmes classificada como forte, moderada ou fraca não mostrou interferir na CMEB de ambos os fármacos. Também não foi observada relação entre concentrações inibitórias mínimas (CIM) desses fármacos em cultivos planctônicos com as CMEB. Por fim, este estudo mostra a dificuldade em eliminar biofilmes de ACB, o que tem potencial impacto na falha terapêutica de infecções causadas por microrganismos organizados desta maneira. Adicionalmente, aponta para a incapacidade dos testes de rotina laboratorial, que são baseados em determinação de CIM em cultivos planctônicos, em prever a suscetibilidade de biofilmes de ACB a antimicrobianos.

Palavras-chave: Polimixina B. Tobramicina. Resistência bacteriana. Biofilme. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

ABSTRACT

The prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from several hospital samples is increasing steadily. Members of the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex resistant to antimicrobials are one of the main microorganisms that cause healthcare associated infections worldwide. The permanence in the environment and the complexity of treatment are further complicated by the capacity to form biofilm, which can prevent the action of antibiotics and other antimicrobial agents. In this context, this study aimed to analyze the capacity of tobramycin and polymyxin B in eradicating the biofilms formed by clinical isolates of ACB. It used 19 clinical ACB isolates and the capacity to form biofilm and the susceptibility to tobramycin and polymyxin B in planktonic state were determined. The isolates were grown for 48 hours in microplates for the formation of biofilm. After that, the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) was determined, employing concentrations of 1 to 32 $\mu\text{g/mL}$ and 2 to 256 $\mu\text{g/mL}$ of polymyxin B and tobramycin, respectively. It was observed that the concentration of polymyxin B needed to eradicate all ACB biofilms was higher than 32 $\mu\text{g/mL}$. For tobramycin, two isolates presented a MBEC of 256 $\mu\text{g/mL}$, while the remaining isolates presented a MBEC higher than 256 $\mu\text{g/mL}$. The intensity of biofilms was classified as strong, moderate or weak, and it did not present any interference in the MBEC of both drugs. Also, it was not observed any relation in the minimal inhibitory concentration (MIC) observed in planktonic state and the MBEC for both antibiotics. Finally, this study shows the difficulty in eradicating ACB biofilms, which has potential impact in therapeutic failure in infections caused by them. Additionally, it shows the incapacity of routine laboratory tests, which are based in determination of MIC in planktonic cultures, to predict the susceptibility of ACB biofilms to antimicrobials.

Keywords: Polymyxin B. Tobramycin. Bacterial resistance. Biofilm. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Linha do tempo da resistência a antimicrobianos.....	10
Figura 2 – Mecanismos gerais de resistência a antimicrobianos.....	12
Figura 3 – Representação esquemática da formação de biofilme.....	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	9
Resistência bacteriana	9
Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> (ACB)	12
Biofilme	13
Testes de susceptibilidade	16
Tratamento para infecções por ACB	17
Polimixina B	17
Tobramicina	18
1.1 JUSTIFICATIVA	19
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo geral	20
1.2.2 Objetivos específicos	20
2 ARTIGO CIENTÍFICO	21
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MICROBIOLOGICAL RESEARCH	41

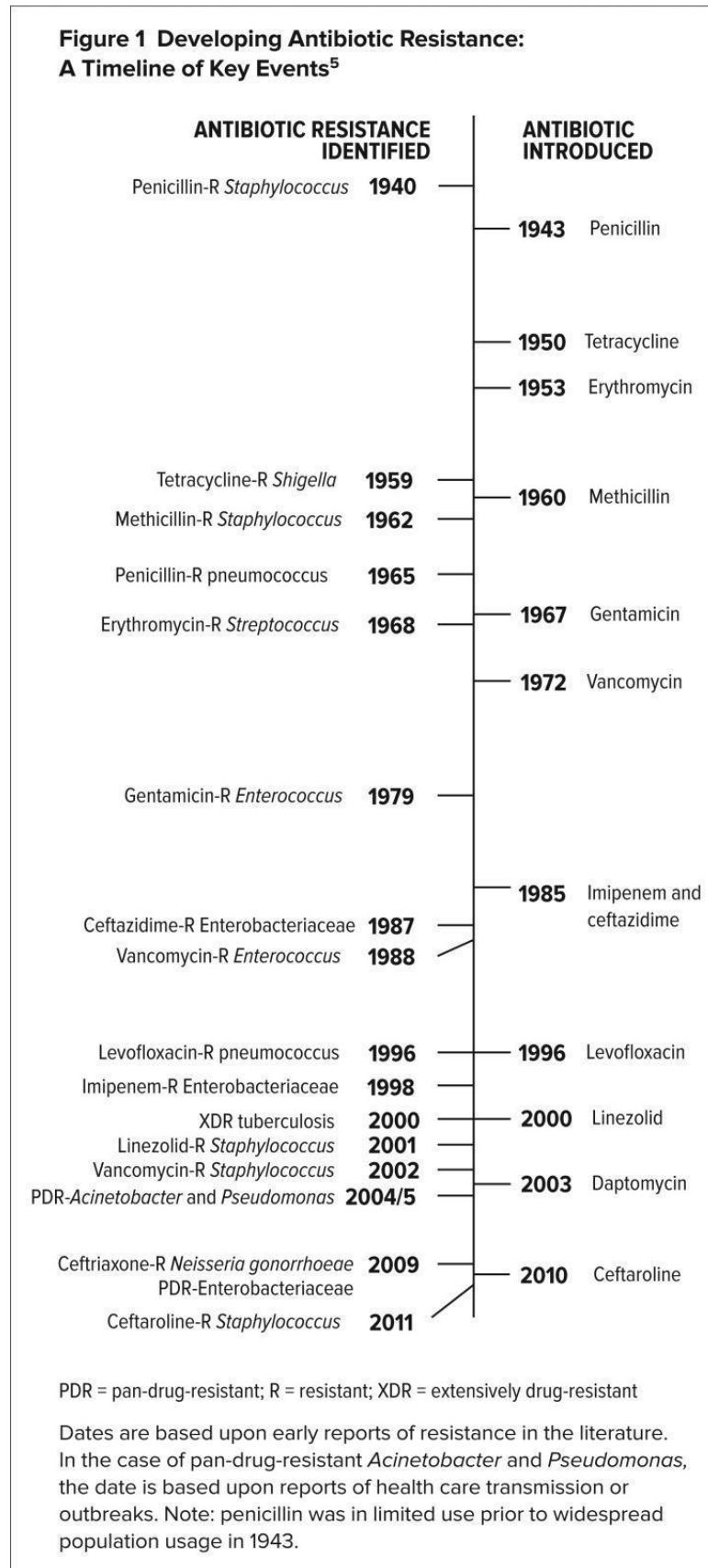
1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) são consideradas uma das principais causas mortalidade e morbidade em pacientes internados (STONE, 2009) Estima-se que, atualmente, o Brasil apresente uma prevalência em torno de 15% de IRAS (ALVIM; SANTOS, 2017). O prognóstico dos pacientes com IRAS é especialmente desfavorecido devido à alta incidência de casos envolvendo resistência a antimicrobianos (ANVISA, 2019).

Resistência bacteriana

Resistência bacteriana aos antimicrobianos é um dos grandes problemas de saúde mundial. A penicilina foi introduzida no tratamento de infecções na década de 1940, tornando-se um sucesso no tratamento de soldados da Segunda Guerra Mundial (VENTOLA, 2015). Porém, a resistência à penicilina começou a aparecer na década de 1950, e novas gerações dos β -lactâmicos, juntamente com novas classes de antibióticos nas décadas seguintes foram introduzidas no mercado (VENTOLA, 2015). Em revisão realizada em 2015, infelizmente, foi relatado que já existiam isolados resistentes a praticamente todos os antibióticos introduzidos no mercado até aquele momento, conforme mostrado na figura 1.

Figura 1- Linha do tempo da resistência a antimicrobianos



Adaptado de Ventola (2015), linha do tempo delimitando os principais eventos no desenvolvimento da resistência aos principais antimicrobianos, juntamente com a data de introdução no mercado de cada antimicrobiano. As datas são baseadas nos primeiros relatos de resistência na literatura, e no caso de

Acinetobacter e *Pseudomonas* pan-resistentes, a data é baseada em relatos de transmissão na saúde e surtos.
Nota: a penicilina tinha o seu uso limitado antes de 1943.

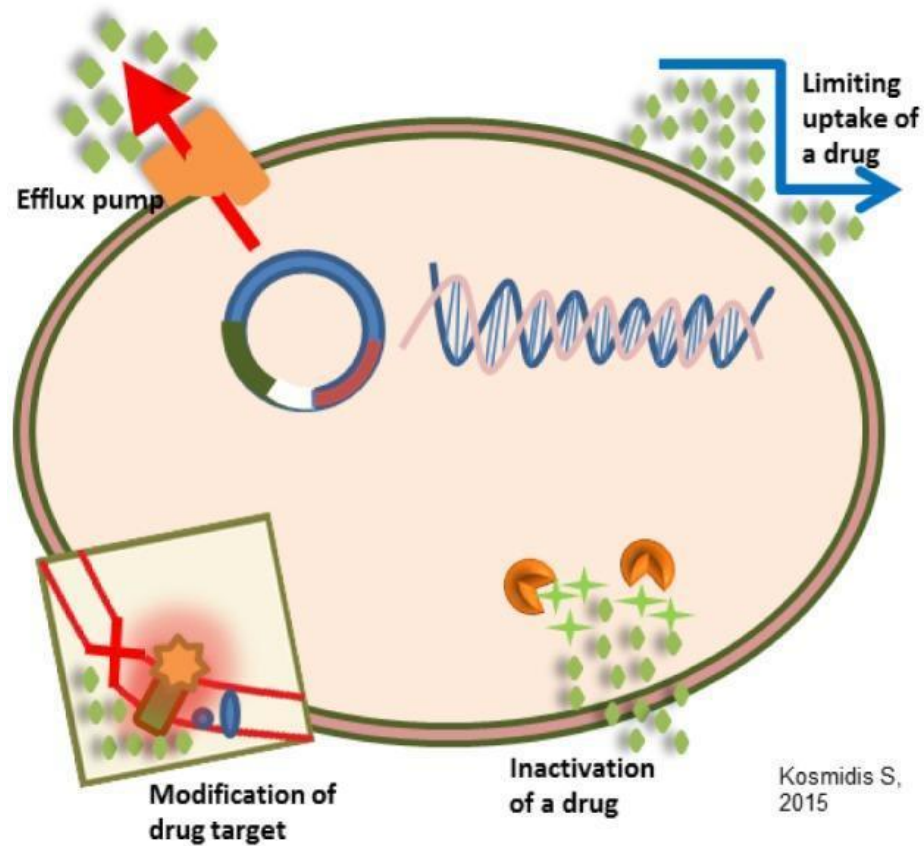
De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a resistência bacteriana é considerada uma das principais ameaças para a saúde mundial, segurança alimentar e desenvolvimento geral (“Antibiotic resistance”, [s.d.]). A crise atual se deve a diversos fatores, tanto devido à natureza microbiana ou humana. Bactérias possuem estruturas relativamente simples quando comparadas a estruturas eucarióticas, e além disso, possuem tempos de geração bem menores, permitindo uma rápida e eficiente adaptação ao ambiente (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). Com a pressão seletiva positiva causada pelos antimicrobianos, e mutações observáveis pela rápida reprodução, resistência a antimicrobianos não é só favorecida, como inevitável (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014).

Além disso, o comportamento humano no uso de antimicrobianos contribui para a rápida disseminação da resistência, cabendo destacar a concentração urbana da população, que permite a rápida disseminação de doenças, o uso exagerado de antimicrobianos, a prescrição inapropriada e até recentemente, compra de antimicrobianos sem prescrição médica. Outros fatores também influenciam, como por exemplo, o uso extensivo em agropecuária, baixa oferta de novos antibióticos, e relutância em vacinação contribuem para o cenário atual (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014; VENTOLA, 2015).

Existem diversos mecanismos de resistência que as bactérias utilizam para contornar a ação dos antimicrobianos. Geralmente esses mecanismos são adquiridos por meio de transferência horizontal de genes, seja por transformação, transposição ou conjugação, ou também pela mutação própria do DNA bacteriano (REYGAERT, 2018). A transferência gênica horizontal pode ser mediada por plasmídeos ou por bacteriófagos, mas alguns microrganismos, como *Acinetobacter* spp., também são naturalmente competentes, mesmo em ambiente clínico (DOMINGUES et al., 2019; REYGAERT, 2018).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro grupos gerais: extrusão por bombas de efluxo, modificação do alvo, inativação e limitação da absorção do antimicrobiano (REYGAERT, 2018). Os mecanismos estão ilustrados na figura 2. Com esses mecanismos, os microrganismos conseguem uma rápida adaptação a uma vasta gama de antimicrobianos, de forma que a pesquisa e a indústria farmacêutica não conseguem acompanhar.

Figura 2- Mecanismos gerais de resistência a antimicrobianos



Adaptado de Reygaert (2018), onde demonstra os mecanismos gerais de resistência, que podem ser classificados como: extrusão por bombas de efluxo, modificação do alvo, inativação e limitação da absorção do antimicrobiano

Considerando a resistência bacteriana no contexto hospitalar, é necessário ressaltar os microrganismos conhecidos como ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (RICE, 2008). Estes microrganismos têm se mostrado resistentes à grande maioria dos antimicrobianos presentes no mercado. No Brasil, *A. baumannii* é um dos principais microrganismos encontrados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto, apresentando altas taxas de resistência (ANVISA, 2019).

Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB)

Bactérias do gênero *Acinetobacter* são geralmente caracterizadas como cocobacilos gram-negativos, catalase-positivos, oxidase-negativos, não móveis e não fermentadores (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Clinicamente, o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) é considerado o mais relevante, visto que as IRAS causadas por membros do gênero *Acinetobacter* geralmente provêm desse complexo. O complexo ACB

é composto pelas espécies *A. baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* (NEMEC et al., 2011; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

É importante notar também que enquanto *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* são geralmente responsáveis por infecções, a espécie *A. calcoaceticus* raramente é encontrada em infecções, e geralmente é isolada em amostras de solo e água. Porém, como esta espécie ambiental compõe a denominação do complexo, ACB pode ser um nome que não necessariamente representa os principais patógenos do grupo (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Estas espécies possuem uma similaridade genética grande, e testes presuntivos geralmente não conseguem diferenciá-las. Até recentemente, as espécies *A. pittii* e *A. nosocomialis* possuíam as nomenclaturas provisórias de *Acinetobacter* espécie genômica 3 e *Acinetobacter* espécie genômica 13TU, respectivamente (NEMEC et al., 2011).

Com o avanço de técnicas moleculares, a diferenciação entre espécies pode ser feita pelo sequenciamento dos genes *rpoB*, *gyrB* e RNAr 16S, entre outros genes, bem como pela utilização de espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*) (TOH et al., 2015). Porém, a diferenciação, muitas vezes, não é realizada, justamente pela complexidade e demora dos testes, sendo classificada somente como complexo ACB (LA SCOLA et al., 2006; TOH et al., 2015).

O complexo ACB é responsável principalmente por casos de pneumonia hospitalar, principalmente em pacientes utilizando ventilação mecânica. ACB também é responsável por alguns casos de pneumonia comunitária, principalmente em pacientes com histórico de abuso alcoólico, infecções de corrente sanguínea, infecções do trato urinário e meningites (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

O complexo ACB teve grande sucesso clinicamente não somente pela alta taxa de resistência a antimicrobianos, mas também pela capacidade de formação de biofilme (YANG et al., 2019), e com isso, a permanência em superfícies sem que a sua virulência seja perdida (CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ et al., 2018). Logo, o estado de biofilme é fundamental para o sucesso e disseminação da resistência em ACB.

Biofilme

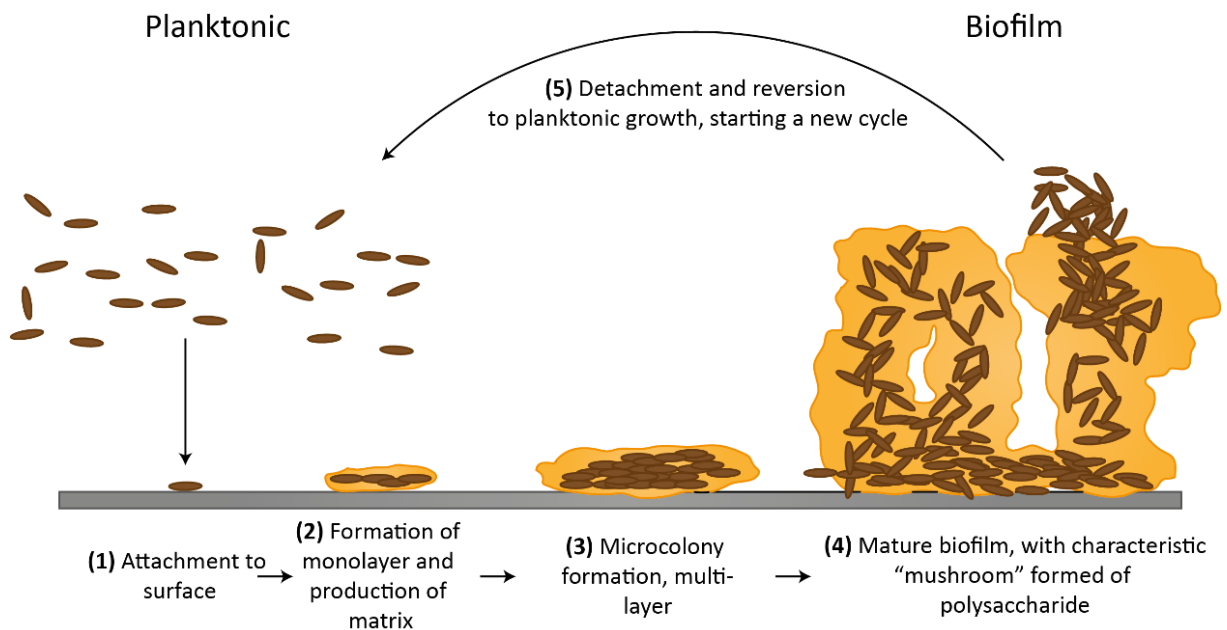
O biofilme é considerado um agregado celular, com alto nível de organização, que está associado a uma superfície, e envolvido por uma matriz extracelular composta por água e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (DONLAN, 2002; FLEMMING et al., 2016;

FLEMMING; WINGENDER, 2010). A composição do biofilme é complexa, contendo diversos polissacarídeos, proteínas, DNA livre, lipídeos e outros componentes orgânicos, além de apresentar diversas funções, níveis de organização e interações sociais (DINCER; USLU; DELIK, 2020; FLEMMING et al., 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010; WILKING et al., 2011).

O componente celular compõe cerca de 10% do biofilme, sendo que o resto consiste em EPS, que é responsável pela adesão do biofilme à superfície, interação intercelular e estrutura arquitetural do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ainda não se tem todos os componentes da matriz elucidados, visto que muitas vezes são difíceis de se isolar e pela grande diversidade presente, porém, já se observou diversas funções para cada substância estudada (FLEMMING et al., 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As etapas de formação do biofilme podem ser resumidas em cinco estágios: adesão à superfície, formação da primeira camada de células aderidas e produção de matriz extracelular, formação de micro colônia com várias camadas, maturação da arquitetura do biofilme e, finalmente, reversão ao estado planctônico com a dispersão das células e desconstrução da matriz (DINCER; USLU; DELIK, 2020; HOLLMANN; PERKINS; WALSH, [s.d.]). Estas etapas estão ilustradas na figura 3, porém é importante notar que a formação de biofilme é um processo complexo e que tanto as propriedades da célula microbiana, quanto da superfície influenciam nas etapas de formação (DONLAN, 2001).

Figura 3- Representação esquemática da formação de biofilme



Fonte: HOLLMANN; PERKINS; WALSH, [s.d.]

A capacidade do complexo ACB em formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas é preocupante, visto que aumenta a propensão de IRAS devido à colonização de superfícies hospitalares e equipamentos médicos, como cateteres, tubos endotraqueais e próteses diversas (JAMAL et al., 2018). Ademais, já foram encontrados isolados clínicos de *A. baumannii* em estado de biofilme em superfícies plásticas e de vidro (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014).

Em isolados de *A. baumannii*, foi observada a importância de diversos genes na regulação e formação de biofilme. O gene *bap* tem um papel importante na adesão intercelular, acumulação de células e estabelecimento do biofilme (YANG et al., 2019), enquanto a regulação deste é influenciada pela densidade celular bacteriana, presença de diversos nutrientes e concentração de cátions. O sistema BfmRS ativa a expressão do sistema de chaperonas CsuA/BABCDE, que, por sua vez, é responsável pela produção do pili, necessário para a adesão bacteriana em superfícies de poliestireno (LIN; LIN; LAN, 2020; LUO et al., 2015). A proteína de membrana externa A (OmpA), uma porina β -barril que atua na permeabilidade celular, além de atuar na adesão em superfícies, também tem papel parcial na formação de biofilmes robustos em superfícies plásticas, atuando juntamente com o operon *csu* (LIN; LIN; LAN, 2020; SMANI et al., 2014; YANG et al., 2019). A expressão do gene *bla_{PER-1}*, que codifica a β -lactamase de espectro estendido PER-1, em isolados clínicos de *A. baumannii* foi identificada como importante para a adesão e formação de biofilme em células epiteliais (LEE et al., 2008; YANG et al., 2019). Logo, pode se observar que a formação, regulação e crescimento de biofilme em ACB é um processo multifatorial e complexo, onde nem todos os componentes ainda estão elucidados.

Estudos mostram que o crescimento na condição de biofilme pode contribuir para disseminação de resistência (DONLAN, 2001; YANG et al., 2019). Visto que a transferência horizontal de genes em biofilme é de uma magnitude bem maior quando comparada com o que ocorre em crescimento planctônico, o estado de biofilme favorece a resistência adquirida a antimicrobianos (DONLAN, 2001; STALDER; TOP, 2016).

Além disso, o estado de biofilme promove a resistência intrínseca a antimicrobianos por diversos mecanismos, visto que pode dificultar a difusão de alguns antimicrobianos pela matriz extracelular, e, conseqüentemente, evitando o contato dos antimicrobianos com os microrganismos e a inativação destes (DINCER; USLU; DELIK, 2020). Outro possível mecanismo de resistência intrínseca seria que microrganismos em estado de biofilme possuem taxas de divisão heterogêneas, principalmente devido à formação de gradientes de nutrientes e oxigênio (FLEMMING et al., 2016). Visto que algumas classes de antimicrobianos atuam em certas fases de divisão, a eficácia destes pode ser diminuída, bem como a taxa de absorção

destes pode ser reduzida (DINCER; USLU; DELIK, 2020). Finalmente, outros fatores também influenciam na falha terapêutica em biofilme, como *quorum sensing*, alta concentração de enzimas degradadoras de antimicrobianos e presença de DNA na matriz, células *persisters*, diversidade genética, interações entre espécies, entre outros (DINCER; USLU; DELIK, 2020).

Com essa discrepância entre o estado planctônico e biofilme, muitos testes de determinação de susceptibilidade que utilizem o estado planctônico podem fornecer resultados não representativos para possível tratamento de infecções causadas por biofilme (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014).

Testes de susceptibilidade

Os testes para avaliação de susceptibilidade utilizados clinicamente geralmente são realizados com os microrganismos em estado planctônico, tais como disco-difusão e determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seja por microdiluição, macrodiluição ou diluição em ágar (BAYOT; BRAGG, 2020; RELLER et al., 2009). Entretanto, estes testes, especialmente disco-difusão em ágar, são muito utilizados principalmente pela sua facilidade e rapidez, além do baixo custo dos materiais necessários.

Porém, quando se observa o biofilme e todas as suas interações complexas, muitas vezes, são necessários outros parâmetros para avaliar se existe chance de sucesso terapêutico (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014), uma vez que, quando em biofilme, as células tendem a possuir resistência e tolerância muito maior aos antimicrobianos (FLEMMING et al., 2016).

Existem testes para a avaliação de susceptibilidade em biofilme *in vitro* (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014). Alguns testes são realizados em sistemas fechados, que são mais simples e práticos e apresentam menor risco de contaminação, porém não reproduzem muito bem as interações complexas do biofilme com o ambiente (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014). Os sistemas abertos têm o benefício de serem mais dinâmicos, além de possibilitar a observação de parâmetros de farmacodinâmica e farmacocinética, porém esses testes tendem a ser mais caros e exigem equipamentos mais complexos (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014).

Também é importante notar que os modelos atuais de avaliação em biofilme, tanto fechados quanto abertos, tem suas limitações, incluindo o fato de não representar completamente uma situação *in vivo*, além de serem métodos mais demorados, complexos e, geralmente, tendem a ser mais caros (COENYE et al., 2018; MACIA; ROJO-MOLINERO;

OLIVER, 2014). Porém, mesmo não sendo ideais, ainda são necessários, principalmente no contexto de pesquisa, para se avaliar e entender as interações entre antimicrobiano e biofilme.

Clinicamente, a observação somente da CIM em estado planctônico pode levar a um diagnóstico errôneo do curso e tratamento para infecções, principalmente aquelas associadas a cateteres, tubos endotraqueais ou outros equipamentos que possuem altos índices de formação de biofilme (JAMAL et al., 2018; WATERS; RATJEN, 2017). A falha terapêutica para infecções causadas por ACB são comuns devido a todos os fatores mencionados anteriormente, e a determinação da CIM, muitas vezes, não revela o cenário real presente na infecção, podendo perder um tempo precioso no tratamento do paciente (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020; MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014; WATERS; RATJEN, 2017).

Tratamento para infecções por ACB

O tratamento para infecções causadas por ACB é preferencialmente realizado com β -lactâmicos, principalmente carbapenêmicos. Porém, desde a década de 1990 se observa a disseminação de isolados resistentes a carbapenêmicos, o que, geralmente, é mediado por carbapenemases, levando à falta de opções para o tratamento dessas infecções (HIGGINS et al., 2010; KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020). No Brasil, os números são preocupantes, em torno de 79% dos isolados de *Acinetobacter* spp. em UTI adulto são resistentes a carbapenêmicos, 44% em UTI pediátrica e 28% em UTI neonatal (ANVISA, 2019).

Para combater esse problema crescente, usualmente o tratamento é feito com terapia combinada de diversas classes de antimicrobianos, principalmente polimixinas, aminoglicosídeos e tigeciclina (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

Polimixina B

A polimixina B foi descoberta na década de 1950, juntamente com outras polimixinas, e foi liberada para o uso clínico. Esta classe de antimicrobianos é composta por poli lipopeptídeos catiônicos, consistindo de um heptapeptídeo cíclico com uma cauda tripeptídica acetilada no terminal N por um ácido graxo (AVEDISSIAN et al., 2019; GUPTA et al., 2009). Este fármaco atua na membrana celular bacteriana, a parte peptídica catiônica interage com o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, visto que este é aniônico, levando ao deslocamento de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), causando instabilidade na membrana e vazamento dos conteúdos celulares e consequente morte celular (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ,

2005; GUPTA et al., 2009; LIMA et al., 2020). Porém, o seu uso saiu de circulação gradualmente durante a década de 1980 devido aos efeitos adversos graves reportados, como a alta nefrotoxicidade e neurotoxicidade (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ, 2005; LIMA et al., 2020).

Após a década de 1980, a polimixina B permaneceu no mercado somente em soluções oftálmicas e tópicas, visto que estas não apresentam o risco dos efeitos adversos supramencionados (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ, 2005). Com o aumento de casos de ACB resistentes a carbapenêmicos, em anos recentes, esse antimicrobiano retornou a ser utilizado de forma intravenosa (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020; LIMA et al., 2020).

Embora a administração da polimixina B seja realizada principalmente pela via intravenosa, este fármaco também pode ser administrado de forma intratecal e aerolizada, enquanto a administração oral não é viável devido à baixa biodisponibilidade (AVEDISSIAN et al., 2019). A dosagem é monitorada visto que a janela terapêutica desse antimicrobiano é estreita e os efeitos adversos são graves (AVEDISSIAN et al., 2019; LIMA et al., 2020). Mas, entre as polimixinas utilizadas, a polimixina B ainda apresenta uma menor variação farmacodinâmica por ser administrada em sua forma ativa (AVEDISSIAN et al., 2019).

Relatos de resistência já foram reportados para a polimixina B em casos de ACB, geralmente devido a mutações do LPS que diminuem a interação da polimixina B com a membrana (LIMA et al., 2020). Por conta dos efeitos adversos, o seu uso geralmente é indicado somente como última escolha, e para evitar a possibilidade de resistência, geralmente é associado a outro antimicrobiano (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020; LIMA et al., 2020).

Tobramicina

Tobramicina é um fármaco de amplo espectro pertencente à classe dos aminoglicosídeos, que, atualmente, tem sido utilizado principalmente para tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes a carbapenêmicos, incluindo ACB (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020). A tobramicina foi introduzida no mercado em 1967, porém seu uso foi diminuído na década de 1980 devido a relatos de nefrotoxicidade e ototoxicidade (ZHANEL et al., 2012).

Os aminoglicosídeos têm afinidade pelo sítio aminoacil-RNAt (sítio A), na porção RNAr 16S da subunidade 30S do ribossomo procariótico. Com isso, ocorre tradução errônea

do RNAm, inibindo a translocação, o que leva a erro na síntese proteica e, conseqüente, morte celular (ZHANEL et al., 2012).

Recentemente, a tobramicina tem sido utilizada na forma aerolizada para o tratamento de infecções por ACB resistentes a carbapenêmicos, usualmente em terapia combinada com outra classe de antimicrobiano (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020; WANG et al., 2020). Esta forma de terapia é indicada principalmente para casos de pneumonia associada à ventilação mecânica (ARNOLD; SAWYER; KOLLEF, 2012; SHI et al., 2019).

Resistência à tobramicina geralmente é devida à modificação ribossômica, alteração da absorção, efluxo e produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (ZHANEL et al., 2012). Para evitar a disseminação da resistência e garantir sucesso terapêutico, a administração da tobramicina tem sido feita juntamente com outros antimicrobianos (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

1.1 JUSTIFICATIVA

A alta incidência de resistência a antimicrobianos em isolados de ACB, juntamente com a capacidade de formação de biofilme por esse microrganismo, condição frequentemente associada a quadros clínicos graves, consiste em uma grande ameaça para a saúde mundial. Desta forma, se faz necessário estabelecer a capacidade de antimicrobianos, tais como polimixina B e tobramicina, em erradicar biofilmes de ACB, bem como se a concentração necessária para erradicação de biofilmes pode ser relacionada com aquela observada para inibir o crescimento em cultivo planctônico, que é comumente utilizada para orientação terapêutica na prática clínica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade dos antimicrobianos tobramicina e polimixina B em erradicar biofilmes formados por isolados hospitalares de ACB.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de formação de biofilme por isolados hospitalares de ACB;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de tobramicina e polimixina B para isolados de ACB;
- Determinar a concentração mínima de polimixina B para erradicação de biofilme de isolados de ACB;
- Determinar a concentração mínima de tobramicina para erradicação de biofilme de isolados de ACB;
- Determinar se existe correlação entre CIM, capacidade de formação de biofilme e concentração mínima para erradicação de biofilme (CMEB) nos isolados de ACB analisados.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado "Avaliação da Erradicação de Biofilme de *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*" foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico Microbiological Research.

1 **Avaliação da Erradicação de Biofilme de *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

2

3

4 Mariana Leyser, Stephanie Wagner Gallo, Carine Cavalheiro, Sílvia Dias de Oliveira*

5

6 PUCRS, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Laboratório de Imunologia e Microbiologia,

7 Porto Alegre, RS, Brazil

8

9 *Corresponding author:

10 *E-mail address:* silviadias@pucrs.br (S. D. Oliveira)

11

12 **Resumo**

13 Cada vez mais se observa a prevalência de resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas
14 de diversas amostras hospitalares. Membros do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-*
15 *baumannii* (ACB) resistentes a antimicrobianos estão entre os principais microrganismos
16 causadores de infecções relacionadas à assistência em saúde em todo o mundo. A permanência
17 no ambiente e a dificuldade de tratamento são especialmente agravadas pela sua capacidade de
18 formar biofilme, visto que a presença do biofilme pode dificultar a ação de antibióticos e de
19 outros agentes antimicrobianos. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar
20 a capacidade dos antimicrobianos tobramicina e polimixina B em erradicar biofilmes formados
21 por isolados hospitalares de ACB. Para isso, foram utilizados 19 isolados de ACB oriundos de
22 amostras clínicas. A capacidade destes isolados em formar biofilme, bem como a
23 suscetibilidade de cultivos planctônicos à tobramicina e à polimixina B, foram analisadas. Os
24 isolados foram cultivados por 48 h em microplacas na condição de biofilmes. Após este período,
25 a concentração mínima para erradicação de biofilme (CMEB) foi avaliada empregando os
26 fármacos tobramicina e polimixina B, expondo a concentrações de polimixina B, que variaram
27 de 1 a 32 µg/mL, e concentrações de tobramicina de 2 a 256 µg/mL. Foi observado que a
28 concentração de polimixina B necessária para erradicar biofilme de ACB em todos os isolados
29 analisados foi superior a 32 µg/mL, enquanto ao avaliar a tobramicina, dois isolados
30 apresentaram a CMEB de 256 µg/mL, e o restante apresentou concentração superior a 256
31 µg/mL. A intensidade dos biofilmes classificada como forte, moderada ou fraca não mostrou
32 interferir na CMEB de ambos os fármacos. Também não foi observada relação entre
33 concentrações inibitórias mínimas (CIM) desses fármacos em cultivos planctônicos com as
34 CMEB. Por fim, este estudo mostra a dificuldade em eliminar biofilmes de ACB, o que tem
35 potencial impacto na falha terapêutica de infecções causadas por microrganismos organizados
36 desta maneira. Adicionalmente, aponta para a incapacidade dos testes de rotina laboratorial,
37 que são baseados em determinação de CIM em cultivos planctônicos, em prever a
38 suscetibilidade de biofilmes de ACB a antimicrobianos.

39 **Palavras-chave:** Polimixina B. Tobramicina. Resistência bacteriana. Biofilme. *Acinetobacter*
40 *calcoaceticus-baumannii*

41 **Introdução**

42 As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) são consideradas uma das
43 principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes internados, causando não só
44 prejuízo econômico como grande sofrimento humano (Stone, 2009). Além disso, o aumento em
45 isolados resistentes a antimicrobianos em IRAS tem contribuído significativamente ao aumento
46 de mortalidade dessas infecções (Simões et al., 2016). Entre os principais microrganismos
47 causadores de IRAS e que possui altas taxas de resistência a antimicrobianos, pode se apontar
48 o gênero *Acinetobacter* (Almasaudi, 2018; ANVISA, 2019).

49 *Acinetobacter* é um gênero composto por cocobacilos gram-negativos, não
50 fermentadores de glicose (Almasaudi, 2018). Porém, no ambiente hospitalar, é importante notar
51 o complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), principalmente a espécie
52 *Acinetobacter baumannii*, visto que este está altamente presente em IRAS (Bonell et al., 2019;
53 Huang et al., 2018; Peleg et al., 2008). Reforçando a importância desta espécie como agente de
54 infecções com falha terapêutica, a Organização Mundial da Saúde incluiu *A. baumannii* na lista
55 de patógenos prioritários resistentes a antimicrobianos na tentativa de promover pesquisa e
56 desenvolvimento de novos fármacos (“WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics
57 are urgently needed,” n.d.).

58 O complexo ACB é capaz de permanecer em superfícies hospitalares por longos
59 períodos de tempo, o que contribui para a disseminação do microrganismo e consequente
60 aumento das infecções (Chapartegui-González et al., 2018; Zeighami et al., 2019). A
61 sobrevivência em ambiente hospitalar pode se dever à capacidade de ACB em formar biofilme,
62 que confere proteção a diversos desafios encontrados nestes locais (Yang et al., 2019). Biofilme
63 é uma comunidade microbiana, com alto nível de organização, envolvida em uma matriz
64 extracelular composta por água e por substâncias poliméricas extracelulares (Donlan, 2001;
65 Flemming and Wingender, 2010). A matriz extracelular é responsável pela interação entre
66 células integrantes do biofilme e do biofilme às superfícies onde ele se forma (Flemming and
67 Wingender, 2010; Wilking et al., 2011).

68 A formação de biofilme pode influenciar na eficácia terapêutica, visto que a matriz pode
69 diminuir a difusão de alguns antimicrobianos, diminuir a taxa de crescimento dos
70 microrganismos, aumentar a concentração de enzimas degradadoras de antimicrobianos e
71 bombas de efluxo, entre outros fatores (Dincer et al., 2020; Donlan, 2001; Hathroubi et al.,
72 2016). Não somente isso, genes de resistência podem ser difundidos facilmente em condições
73 de biofilme (Donlan, 2001; Stalder and Top, 2016). Logo, os testes de susceptibilidade

74 normalmente empregados geralmente não são suficientes para prever a eficácia do tratamento,
75 quando em cenário de biofilme (Donlan, 2001; Macia et al., 2014; Waters and Ratjen, 2017).

76 O tratamento de escolha para infecções causadas por ACB é realizado com β -
77 lactâmicos, principalmente carbapenêmicos. Porém, devido às altas taxas de resistência a esses
78 fármacos (Higgins et al., 2010; Karakonstantis et al., 2020), terapias alternativas têm sido
79 utilizadas para combater isolados de ACB resistentes. As polimixinas têm sido utilizadas
80 frequentemente nestas situações, embora resistência a este fármaco também tem sido descrita
81 (Lima et al., 2020). Além das polimixinas, os aminoglicosídeos são opções terapêuticas para
82 infecções causadas por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, incluindo a forma
83 aerolizada de tobramicina (Arnold et al., 2012; Karakonstantis et al., 2020; Shi et al., 2019;
84 Wang et al., 2020).

85 Em vista desse cenário, é necessário determinar a capacidade de polimixina B e
86 tobramicina em erradicar biofilmes de ACB, bem como entender se é possível correlacionar
87 susceptibilidade a estes antimicrobianos em estado planctônico e em biofilme.

88

89

90 **Materiais e métodos**

91 *Isolados bacterianos e condições de cultivo*

92 Dezenove isolados de ACB oriundos de amostras clínicas cedidas pelo Setor de
93 Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital São Lucas da PUCRS foram utilizados neste
94 projeto (Tabela 1). Os isolados estavam armazenados em freezer a -80°C, em caldo *Brain Heart*
95 *Infusion* (BHI) (Kavsi, Roseto degli Abruzzi, Itália), com 20% de glicerol como crioprotetor e
96 foram cultivados em BHI a 37°C para a realização dos experimentos.

97

98 *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*

99 A CIM para tobramicina e polimixina B nos isolados de ACB foi avaliada por
100 microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do CLSI (*Clinical and Laboratory*
101 *Standards Institute*, 2012). Os resultados foram interpretados paralelamente pelas diretrizes do
102 CLSI (2020) e do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*,
103 2020).

104

105 *Determinação da capacidade de formação de biofilme*

106 A capacidade de formação de biofilme foi determinada por meio de técnica de
107 coloração com cristal violeta em microplaca de poliestireno, utilizando protocolo já descrito

108 com algumas modificações (Lee et al., 2008). Todos os isolados foram cultivados por 18 h a
109 37°C em caldo Luria Bertani (LB) [triptona, 10 g/L (Kasvi, Roseto degli Abruzzi, Itália);
110 extrato de levedura, 5 g/L (Himedia, Mumbai, Índia); NaCl, 5 g/L (Nuclear, Diadema, Brasil;
111 pH 7,2]. Uma alíquota de 1 µL de cada cultura foi inoculada em poços de microplacas contendo
112 200 µL de meio fresco, em triplicata, seguindo uma incubação a 37°C por 48 h. Os poços foram
113 lavados duas vezes com tampão salino-fosfato (PBS) [NaCl, 8 g/L (Nuclear); KCl, 0,2 g/L
114 (Nuclear); Na₂HPO₄, 1,44 g/L (Nuclear); e KH₂PO₄, 0,24 g/L (Nuclear)] e corados com cristal
115 violeta a 0,1% por 5 min. Posteriormente, os biofilmes corados foram solubilizados com etanol
116 a 96% por 5 a 10 min e a absorbância da foi avaliada usando uma leitora de microplacas
117 SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) a 570 nm. Os isolados foram
118 classificados segundo Stepanović et al. (2000) **como não formadores de biofilme**
119 **($DO \leq DO_c$)**, fracos formadores de biofilme ($DO_c < DO \leq 2DO_c$), moderados formadores de
120 biofilme ($DO_c < DO \leq 2DO_c$) e fortes formadores de biofilmes ($4DO_c < DO$), onde DO_c é a
121 densidade óptica de corte determinada como a DO média adicionada de três desvios padrões
122 em relação ao controle negativo.

123

124 *Determinação da concentração mínima de polimixina B e tobramicina para erradicação de*
125 *biofilmes de ACB*

126 A determinação da concentração mínima para erradicação de biofilmes (CMEB) seguiu
127 o protocolo já estabelecido com algumas modificações (Ceri et al., 1999). Os isolados de ACB
128 foram primeiramente cultivados em caldo LB por 24 h a 37°C. Então, os isolados foram
129 inoculados em placa de ágar nutriente (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), onde foram cultivados
130 por 24 h a 37°C. Posteriormente, três colônias foram utilizadas para a preparação do inóculo
131 em solução salina a 0,85%, sendo ajustado para 0,5 da escala de McFarland. Uma alíquota de
132 2 µL foi adicionada em uma placa de poliestireno de 96 poços, juntamente com 200 µL de caldo
133 Mueller-Hinton (MH) (Himedia), em triplicata, seguindo incubação por 48 h a 37°C.
134 Subsequentemente, cada poço foi lavado duas vezes com PBS para retirar as células
135 planctônicas, foram adicionados 200 µL de caldo MH e as diversas concentrações dos
136 antibióticos, sendo 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL para a tobramicina (Sigma-Aldrich, St.
137 Louis, EUA) e 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg/mL para polimixina B (Sigma-Aldrich), seguindo incubação
138 por 24 h a 37°C. Após, os poços foram lavados novamente duas vezes com PBS, e 200 µL de
139 caldo MH foram adicionados novamente. Logo depois, a microplaca foi sonicada em um banho
140 ultrassônico Ultra Cleaner 1400A (Unique, Indaiatuba, Brasil) por 5 min para a desintegração

141 do biofilme. Posteriormente, 10 µL de cada diluição foi semeada por meio da técnica da gota,
142 em uma placa de ágar nutriente, em triplicata, e incubada por 24 h a 37°C. O crescimento
143 bacteriano foi determinado visualmente, comparado a um controle positivo, onde os isolados
144 de ACB foram cultivados sem a presença dos antimicrobianos, e a CMEB foi definida como a
145 concentração mínima necessária para que não houvesse crescimento em nenhuma das triplicatas
146 dos isolados de ACB.

147

148

149 **Resultados**

150 *CIM em cultivo planctônico de ACB*

151 Treze isolados (68,4%) foram susceptíveis à polimixina B, mas, de acordo com os
152 critérios recentes do CLSI, estes isolados são denominados como susceptíveis com exposição
153 aumentada (CLSI, 2020). Os demais seis isolados (31,6%) foram considerados resistentes.
154 Considerando tanto os critérios de interpretação do CLSI como do EUCAST, 10 isolados
155 (52,6%) foram susceptíveis à tobramicina. De acordo com a classificação do EUCAST, os
156 demais nove isolados (47,4%) foram resistentes a este fármaco, o que difere do CLSI, onde,
157 para este fármaco, ainda permanece a classificação como intermediário, sendo um isolado
158 enquadrado nesta categoria (Tabela 1).

159

160 *Capacidade de formação de biofilme*

161 Todos os isolados de ACB foram capazes de formar biofilme em poliestireno. Seis
162 isolados apresentaram uma forte capacidade de formação de biofilme, enquanto nove e quatro
163 isolados foram classificados como moderados e fracos formadores de biofilme, respectivamente
164 (Tabela 2).

165

166 *CMEB de polimixina B e tobramicina*

167 Todos os isolados de ACB apresentaram uma CMEB superior a 32 µg/mL de polimixina
168 B, independentemente da CIM encontrada em cultivo planctônico. Resultado similar foi
169 observado testando tobramicina, onde 17 isolados apresentaram CMEB superior a 256 µg/mL
170 e dois apresentaram CMEB de 256 µg/mL de tobramicina (Tabela 2).

171

172

173

174 **Discussão**

175 A capacidade de formar biofilme e de resistir a diferentes fármacos antimicrobianos
176 vêm sendo amplamente descritas em ACB (Almasaudi, 2018; Peleg et al., 2008; Yang et al.,
177 2019), sendo duas estratégias de sobrevivência para esses microrganismos (Krzyściak et al.,
178 2017), o que torna o tratamento de infecções causadas por ACB um preocupante desafio,
179 especialmente em ambiente hospitalar.

180 A escolha do tratamento de infecções causadas por biofilmes é norteadada pelos resultados
181 observados nos ensaios que avaliam a susceptibilidade a antimicrobianos em cultivos
182 planctônicos (Donlan, 2001; Peleg et al., 2008). Entretanto, observamos que a CMEB não
183 mostrou estar relacionada a CIM nos testes de microdiluição, mesmo empregando fármacos
184 com mecanismos de ação distintos como polimixina B e tobramicina. Isolados susceptíveis,
185 assim como isolados resistentes à tobramicina e à polimixina B, apresentaram CMEB acima
186 das maiores concentrações testadas, indicando um possível insucesso para o tratamento de
187 infecções causadas por biofilmes desses isolados de *Acinetobacter* spp. Desta forma, valores de
188 CIM não representam embasamento de estratégia para um cenário clínico real, o que pode levar
189 a investimento financeiro e de recursos humanos que contribuam para uma falha terapêutica,
190 colocando a vida dos pacientes em risco.

191 As concentrações de antimicrobianos utilizadas nesse estudo são elevadas, em
192 comparação com àquelas empregadas clinicamente. As concentrações intravenosas máximas
193 para polimixina B e tobramicina são em torno de 14 e 30 µg/mL, respectivamente (Avedissian
194 et al., 2019; Beringer et al., 2000), ou seja, pelo menos 2,3 a 8,5 vezes inferiores às CMEBs
195 encontradas. É estabelecido que antimicrobianos como a polimixina B possuem uma janela
196 terapêutica estreita e que concentrações como as utilizadas nesse estudo provavelmente iriam
197 causar diversos efeitos adversos graves (Avedissian et al., 2019; Falagas et al., 2005). Logo, é
198 possível inferir que em um cenário clínico não seria possível erradicar o biofilme formado por
199 esses isolados com os antimicrobianos testados.

200 A intensidade do biofilme formado não mostrou influenciar na CMEB, uma vez que
201 mesmos valores de CMEB foram obtidos para isolados com capacidade de formar biofilmes de
202 intensidade de fraco a forte. Isto provavelmente se deve à mudança drástica, tanto fisiológica
203 quanto estrutural, apresentada em estado de biofilme. Logo, a presença da matriz e outros
204 componentes, independentemente da quantidade, bem como a alteração das taxas de divisão,
205 podem ser suficientes para alterar a eficácia da polimixina B e tobramicina. Também cabe
206 ressaltar que a susceptibilidade dos isolados aos fármacos testados analisada pela determinação
207 de CIM não foi associada com intensidade de biofilme formado, o que contrapõe relato de que

208 isolados formadores de biofilmes fortes são mais susceptíveis a antimicrobianos (Krzyściak et
209 al., 2017).

210

211

212 **Conclusão**

213 Em conclusão, os resultados encontrados neste estudo demonstram a não relação entre
214 a CMEB, CIM e capacidade de formação de biofilme dos isolados de ACB avaliados, o que
215 aponta para a limitação das estratégias terapêuticas de infecções causadas por biofilmes com
216 base em valores oriundos de células planctônicas. Desta forma, o emprego de métodos que
217 representem melhor o cenário *in vivo* em caso de biofilme é necessário. Dentro deste contexto,
218 a determinação da CMEB proporciona uma visão mais realista do efeito do tratamento de
219 infecções causadas por biofilme, mesmo que um pouco desanimadora. Adicionalmente, é
220 possível inferir que independentemente da intensidade do biofilme, a erradicação deste será
221 quase impossível com tratamento com polimixina B ou tobramicina. Finalmente, mais estudos
222 são necessários para melhor entender a dinâmica dos fatores estudados, como outros
223 antimicrobianos interagem nestas condições e como esses achados podem ser refletidos para
224 uma situação *in vivo*.

225

226

227 Apêndices

228

Isolado	Material Biológico	CIM polimixina B ⁽¹⁾ ⁽³⁾ (µg/mL)	CIM tobramicina ⁽²⁾ ⁽⁴⁾ (µg/mL)
C156	Escarro	4	2
B98	Aspirado Traqueal	2	32
B02	Aspirado Traqueal	4	2
C145	Escarro	2	32
B137	Escarro	1	>32
C146	Escarro	8	>32
B48	Aspirado Traqueal	4	4
B44	Aspirado Traqueal	>8	4
C147	Escarro	2	2
B57	Aspirado Traqueal	2	1
C03	Aspirado Traqueal	2	>32
B79	Escarro	2	2
B90	Aspirado Traqueal	2	32
B97	Aspirado Traqueal	1	32
B128	Hemo Catéter	2	2
B136	Escarro	2	2
B64	Aspirado Traqueal	2	4
C66	Escarro	4	8
B09	Aspirado Traqueal	2	>32

229 *Tabela 1: Origem dos isolados de Acinetobacter calcoaceticus-baumannii e Concentrações*
 230 *Inibitórias Mínimas (CIM) de polimixina B e tobramicina*

231

232 ⁽¹⁾Diretrizes de interpretação do CLSI para polimixina B em *Acinetobacter* spp.: suscetível -,
 233 intermediário ≤ 2 , resistente ≥ 4

234 ⁽²⁾Diretrizes de interpretação do CLSI para tobramicina em *Acinetobacter* spp.: suscetível ≤ 4 ,
 235 intermediário 8, resistente ≥ 16

236 ⁽³⁾Diretrizes de interpretação do EUCAST para colistina em *Acinetobacter* spp.: suscetível ≤ 2 ,
 237 resistente > 2

238 ⁽⁴⁾Diretrizes de interpretação do EUCAST para tobramicina em *Acinetobacter* spp.: suscetível
 239 ≤ 4 , resistente > 4

240

241

242

243

Isolado	CMEB polimixina B ($\mu\text{g/mL}$)	CMEB tobramicina ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidade de biofilme
C156	>32	>256	Forte
B98	>32	>256	Forte
B02	>32	>256	Forte
C145	>32	>256	Forte
B137	>32	>256	Médio
C146	>32	>256	Médio
B48	>32	>256	Médio
B44	>32	>256	Fraco
C147	>32	>256	Médio
B57	>32	>256	Forte
C03	>32	>256	Médio

B79	>32	256	Médio
B90	>32	>256	Médio
B97	>32	256	Fraco
B128	>32	>256	Médio
B136	>32	>256	Forte
B64	>32	>256	Médio
C66	>32	>256	Fraco
B09	>32	>256	Fraco

244 *Tabela 2: Intensidade de formação de biofilme e Concentração Mínima para a Erradicação*
 245 *de Biofilme (CMEB) por isolados de Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

246

247

248 **Financiamento**

249 Este estudo foi financiado com recursos provenientes do DECIT/SCTIE-MS via CNPq e
 250 FAPERGS [projeto número 1178-2551/13-6].

251

252 **Aspectos éticos**

253 Este trabalho faz parte de projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS por
 254 parecer de número 483.469.

255 **Referências**

- 256 Almasaudi, S.B., 2018. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology
257 and resistance features. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 586–596.
258 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>
- 259 ANVISA, 2019. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº
260 18: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2017 [WWW Document]. URL
261 <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-18-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2017> (accessed 5.20.20).
- 262
263
264
- 265 Arnold, H.M., Sawyer, A.M., Kollef, M.H., 2012. Use of adjunctive aerosolized
266 antimicrobial therapy in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*
267 *baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care* 57, 1226–1233.
268 <https://doi.org/10.4187/respcare.01556>
- 269 Avedissian, S.N., Liu, J., Rhodes, N.J., Lee, A., Pais, G.M., Hauser, A.R., Scheetz,
270 M.H., 2019. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiotics*
271 8. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010031>
- 272 Beringer, P.M., Vinks, A.A.T.M.M., Jelliffe, R.W., Shapiro, B.J., 2000.
273 Pharmacokinetics of Tobramycin in Adults with Cystic Fibrosis: Implications for
274 Once-Daily Administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 809–813.
- 275 Bonell, A., Azarrafiy, R., Huong, V.T.L., Viet, T.L., Phu, V.D., Dat, V.Q., Wertheim,
276 H., van Doorn, H.R., Lewycka, S., Nadjm, B., 2019. A Systematic Review and Meta-
277 analysis of Ventilator-associated Pneumonia in Adults in Asia: An Analysis of
278 National Income Level on Incidence and Etiology. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect.*
279 *Dis. Soc. Am.* 68, 511–518. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy543>
- 280 Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A., 1999. The
281 Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic
282 Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771–1776.
283 <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999>
- 284 Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J.M., Ramos-
285 Vivas, J., 2018. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time
286 starvation. *PLOS ONE* 13, e0201961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>
- 287 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Methods for dilution antimicrobial
288 susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, 9th ed.

- 289 Document M07-A9. CSLI, Wayne, PA. USA.
- 290 Dincer, S., Uslu, F.M., Delik, A., 2020. Antibiotic Resistance in Biofilm. *Bact.*
291 *Biofilms*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92388>
- 292 Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–
293 890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- 294 Donlan, R.M., 2001. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological
295 Process. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- 296 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Clinical breakpoints
297 and dosing of antibiotics [WWW Document], n.d. URL
- 298 Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D., 2005. Colistin: The Revival of
299 Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial
300 Infections. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333–1341. <https://doi.org/10.1086/429323>
- 301 Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8,
302 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- 303 Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg,
304 S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–
305 575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- 306 Hathroubi, S., Mekni, M.A., Domenico, P., Nguyen, D., Jacques, M., 2016. Biofilms:
307 Microbial Shelters Against Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 23, 147–156.
308 <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0087>
- 309 Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., 2010. Global spread of
310 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 233–
311 238. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp428>
- 312 Huang, H., Chen, B., Liu, G., Ran, J., Lian, X., Huang, X., Wang, N., Huang, Z.,
313 2018. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug
314 resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Infect. Dis.* 18.
315 <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2932-5>
- 316 Karakonstantis, S., Kritsotakis, E.I., Gikas, A., 2020. Treatment options for *K.*
317 *pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems,
318 aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms
319 of resistance to carbapenems. *Infection* 1–17. [https://doi.org/10.1007/s15010-020-](https://doi.org/10.1007/s15010-020-01520-6)
320 [01520-6](https://doi.org/10.1007/s15010-020-01520-6)
- 321 Krzyściak, P., Chmielarczyk, A., Pobiega, M., Romaniszyn, D., Wójkowska-Mach, J.,
322 2017. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm

- 323 production and drug susceptibility. *APMIS* 125, 1017–1026.
324 <https://doi.org/10.1111/apm.12739>
- 325 Lee, H.-W., Koh, Y.M., Kim, J., Lee, J.-C., Lee, Y.-C., Seol, S.-Y., Cho, D.-T., Kim,
326 J., 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*
327 to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 49–
328 54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>
- 329 Lima, W.G., Brito, J.C.M., Cardoso, B.G., Cardoso, V.N., de Paiva, M.C., de Lima,
330 M.E., Fernandes, S.O.A., 2020. Rate of polymyxin resistance among *Acinetobacter*
331 *baumannii* recovered from hospitalized patients: a systematic review and meta-
332 analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 1427–1438.
333 <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03876-x>
- 334 Macia, M.D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A., 2014. Antimicrobial susceptibility testing
335 in biofilm-growing bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 981–990.
336 <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- 337 Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of
338 a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 538–582.
339 <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- 340 Shi, Y., Huang, Y., Zhang, T.-T., Cao, B., Wang, H., Zhuo, C., Ye, F., Su, X., Fan, H.,
341 Xu, J.-F., Zhang, J., Lai, G.-X., She, D.-Y., Zhang, X.-Y., He, B., He, L.-X., Liu, Y.-
342 N., Qu, J.-M., Chinese Thoracic Society, C.M.A., 2019. Chinese guidelines for the
343 diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated
344 pneumonia in adults (2018 Edition). *J. Thorac. Dis.* 11, 2581–2616.
345 <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.06.09>
- 346 Simões, A.S., Couto, I., Toscano, C., Gonçalves, E., Póvoa, P., Viveiros, M., Lapão,
347 L.V., 2016. Prevention and Control of Antimicrobial Resistant Healthcare-Associated
348 Infections: The Microbiology Laboratory Rocks! *Front. Microbiol.* 7.
349 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00855>
- 350 Stalder, T., Top, E., 2016. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations
351 and opportunities. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2, 16022.
352 <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.22>
- 353 Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A
354 modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J.*
355 *Microbiol. Methods* 40, 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- 356 Stone, P.W., 2009. Economic burden of healthcare-associated infections: an American

- 357 perspective. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 9, 417–422.
358 <https://doi.org/10.1586/erp.09.53>
- 359 Wang, J., Kutter, J.P., Mu, H., Moodley, A., Yang, M., 2020. Synergistic antibacterial
360 effect of inhaled aztreonam and tobramycin fixed dose combination to combat
361 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Pharm.* 590, 119877.
362 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119877>
- 363 Waters, V., Ratjen, F., 2017. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility
364 testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.*
365 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009528.pub4>
- 366 WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [WWW
367 Document], n.d. URL [https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-](https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)
368 [of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed) (accessed 11.4.20).
- 369 Wilking, J.N., Angelini, T.E., Seminara, A., Brenner, M.P., Weitz, D.A., 2011.
370 Biofilms as complex fluids. *MRS Bull.* 36, 385–391.
371 <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.71>
- 372 Yang, C.-H., Su, P.-W., Moi, S.-H., Chuang, L.-Y., 2019. Biofilm Formation in
373 *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules* 24.
374 <https://doi.org/10.3390/molecules24101849>
- 375 Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R., Samadi, E., Haghi, F., 2019. Virulence
376 characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii*
377 isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect. Dis.* 19, 629.
378 <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nesse trabalho, conclui-se que não foi possível determinar relação entre CMEB, CIM e capacidade de formação de biofilme nos isolados de ACB analisados. Este estudo apresenta a diferença entre as concentrações de polimixina B e tobramicina necessárias para inibir o crescimento de ACB em estado planctônico e as concentrações mínimas desses fármacos para erradicar os biofilmes formados por esses microrganismos. Além disso, mostra a complexidade no tratamento de infecções causadas por ACB, visto que tanto resistência a antimicrobianos quanto a formação de biofilme, ambas características complexas e multifatoriais, podem ter um papel na falha terapêutica. Também, pode se observar a resistência e tolerância causada pelo biofilme, visto pela alta concentração de antimicrobianos utilizados neste estudo. Com isso, conseguimos avaliar um pouco melhor a influência do estado de biofilme sobre a ação dos antimicrobianos analisados em isolados de ACB.

Perspectivas:

- Determinar a CMEB para outras classes de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por ACB;
- Ampliar o número de isolados de ACB a serem utilizados em ensaios de determinação de CMEB;
- Avaliar a CMEB empregando combinações de fármacos com diferentes capacidades de difusão em biofilme.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, A. L. S.; SANTOS, F. C. R. Medidas de precaução de contato para prevenção e controle de infecções: relato de experiência. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 7, n. 0, 8 jul. 2017.
- Antibiotic resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 27 out. 2020.
- ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 18: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2017**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-18-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2017>>. Acesso em: 20 maio. 2020.
- ARNOLD, H. M.; SAWYER, A. M.; KOLLEF, M. H. Use of adjunctive aerosolized antimicrobial therapy in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 57, n. 8, p. 1226–1233, ago. 2012.
- AVEDISSIAN, S. N. et al. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, 22 mar. 2019.
- BAYOT, M. L.; BRAGG, B. N. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ, I. et al. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0201961, 22 ago. 2018.
- COENYE, T. et al. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 570–572, 1 jun. 2018.
- DINCER, S.; USLU, F. M.; DELIK, A. Antibiotic Resistance in Biofilm. **Bacterial Biofilms**, 12 maio 2020.
- DOMINGUES, S. et al. Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, 24 jan. 2019.
- DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387–1392, 15 out. 2001.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, set. 2002.
- FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K.; SARAVOLATZ, L. D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333–1341, 1 maio 2005.
- FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 11 2016.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, set. 2010.
- GUPTA, S. et al. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. **Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 13, n. 2, p. 49–53, 2009.
- HIGGINS, P. G. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 233–238, 1 fev. 2010.
- HOLLMANN, B.; PERKINS, M.; WALSH, D. Biofilms and their role in pathogenesis. **Clinical & Experimental Immunology**, [s.d.].
- JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 1 jan. 2018.

- KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**, p. 1–17, 1 set. 2020.
- LA SCOLA, B. et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827–832, mar. 2006.
- LEE, H.-W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 49–54, jan. 2008.
- LIMA, W. G. et al. Rate of polymyxin resistance among *Acinetobacter baumannii* recovered from hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 8, p. 1427–1438, 1 ago. 2020.
- LIN, M.-F.; LIN, Y.-Y.; LAN, C.-Y. Characterization of biofilm production in different strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of chemical compounds on biofilm formation. **PeerJ**, v. 8, 28 maio 2020.
- LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **The New Microbiologica**, v. 37, n. 2, p. 119–127, abr. 2014.
- LUO, L. et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. **BMC Microbiology**, v. 15, 7 mar. 2015.
- MACIA, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 981–990, 1 out. 2014.
- MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 145, 2014.
- NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393–404, maio 2011.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, jul. 2008.
- RELLER, L. B. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 1 dez. 2009.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 26 jun. 2018.
- RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 15 abr. 2008.
- SHI, Y. et al. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults (2018 Edition). **Journal of Thoracic Disease**, v. 11, n. 6, p. 2581–2616, 28 jun. 2019.
- SMANI, Y. et al. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1806–1808, mar. 2014.
- STALDER, T.; TOP, E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 2, p. 16022, 19 out. 2016.

- STONE, P. W. Economic burden of healthcare-associated infections: an American perspective. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 9, n. 5, p. 417–422, 1 out. 2009.
- TOH, B. E. W. et al. Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 128–132, nov. 2015.
- VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, abr. 2015.
- WANG, J. et al. Synergistic antibacterial effect of inhaled aztreonam and tobramycin fixed dose combination to combat multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 590, p. 119877, 30 nov. 2020.
- WATERS, V.; RATJEN, F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, n. 10, 5 out. 2017.
- WILKING, J. N. et al. Biofilms as complex fluids. **MRS Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 385–391, maio 2011.
- YANG, C.-H. et al. Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, 14 maio 2019.
- ZHANEL, G. G. et al. Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 4, p. 459–473, 1 jan. 2012.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MICROBIOLOGICAL RESEARCH

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Microbiological Research is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate significant contribution of broad interest. Papers of very specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered.

Studies in the following sections are included:

- Reviews/Minireviews on all aspects
- Microbiology and Genetics
- Molecular and Cell Biology
- Metabolism and Physiology
- Signal transduction and Development
- Biotechnology
- Phytopathology
- Environmental Microbiology and Ecology

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
 - Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
 - Supplemental files (where applicable)
 - Further considerations
 - Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
 - All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
 - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if

accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/MICRES>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text

graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about

- **Methodology and Materials.** Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article.

Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation->

style/microbiological-research When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate

research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted,

indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.