

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii*
SENSÍVEIS E RESISTENTES À POLIMIXINA DE HOSPITAIS BRASILEIROS**

Aluna: Amanda Dal Lin
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Co-Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Pilonetto
e Dr. Paulo Costa Carvalho

Curitiba, 2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE PROTEÔMICA DE AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii*
SENSÍVEIS E RESISTENTES À POLIMIXINA EM HOSPITAIS BRASILEIROS

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Co-Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Pilonetto e
Dr. Paulo Costa Carvalho

Curitiba, 2024

*“De vez em quando a mente do homem é
esticada por uma ideia nova ou sensação
e nunca mais se reduz às suas antigas dimensões.”*

Oliver Wendell Holmes Sr

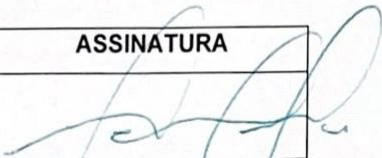


Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **04 dias do mês de julho de 2024 às 09:00**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **“ANÁLISE PROTEÔMICA DE Acinetobacter baumannii RESISTENTES E NÃO RESISTENTES À POLIMIXINA EM HOSPITAIS BRASILEIROS”** apresentado por **Amanda Dal Lin** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira - Presidente	
Prof. Dr. Humberto Maciel Franca Madeira - PUCPR	
Prof. Dr. Afonso Luis Barth - HCPA	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Conceito: *Aprovado*

Prof. Dr. Humberto Maciel Franca Madeira

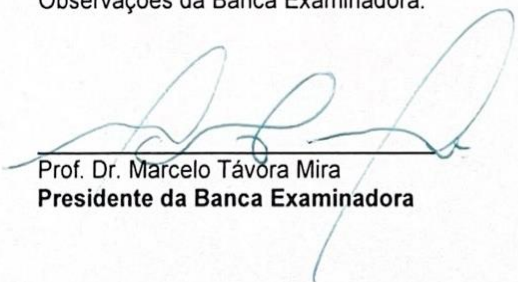
Conceito: *aprovado*

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Conceito:

Parecer Final: *Aprovado*

Observações da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora


Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me guiou e conduziu em todo esse tempo, me dando saúde, força e discernimento. Sem ele, jamais seria possível realizar esse trabalho.

À minha família, que esteve presente nas horas mais difíceis e felizes da minha vida, e que sempre me apoiou nessa caminhada. Precisei abrir mão de muita coisa e minha família foi a base para eu conseguir chegar até aqui. Em especial, à memória de meu pai. Sei que, de onde estiver, ele estará muito feliz por esse momento.

Aos meus verdadeiros amigos que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando a seguir em frente e torcendo por mim. Vocês foram fundamentais nesta jornada.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Távora Mira, por ter acreditado nesta pesquisa, pelas suas precisas e incisivas pontuações que foram imprescindíveis para a qualidade deste trabalho. Também, ao grupo de estudo do Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) pela receptividade e pelas valiosas trocas.

Ao professor Dr. Marcelo Pillonetto, por todo apoio, ensinamentos e confiança, e por sempre compartilhar seu imenso conhecimento na área de resistência antimicrobiana. Sempre foi a minha maior referência nessa área e para tantos outros colegas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da PUCPR, pela oportunidade de estudo.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) e ao setor de Bacteriologia, que abriram as portas para que eu pudesse dar início ao meu trabalho. Apreendi muito e pude conviver com pessoas incríveis, compartilhando conhecimentos diariamente. Não poderia deixar de mencionar a equipe de bolsistas que formamos, mais conhecida como “Green Angels”, devido ao jaleco verde que usávamos. Vocês foram meu suporte em vários momentos. Trocamos alegrias, angústias, e, principalmente, construímos uma amizade que ficará para toda a vida.

Ao Instituto Carlos Chagas (ICC) da Fiocruz/PR e a equipe do Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional, em especial ao meu coorientador, Dr. Paulo Costa Carvalho, à Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer, ao Dr. Marlon Dias Mariano Santos e à doutoranda Amanda Caroline Camillo Andrade por todo acolhimento, parceria, ensinamentos e disposição para que esse trabalho fosse concluído, publicado e tivesse reconhecimento. Vocês foram essenciais e são inspiração para mim na área da pesquisa.

Por fim, sou grata a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada em formato de artigo científico, seguindo a normatização do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Este trabalho foi realizado nas instalações do Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR), em colaboração com o Dr. Paulo Costa Carvalho e sua equipe do Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional (LPEC), em parceria com a Dra. Rosário Duran e equipe da Unidade de Bioquímica Analítica e Proteômica do Instituto Pasteur de Montevideu/IIBCE, que forneceram o protocolo para extração das proteínas, e com o apoio do Dr. Marcelo Pillonetto do setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Estado do Paraná (Lacen-PR), que cedeu as amostras bacterianas. O projeto foi financiado pela Fundação Araucária. Os custos com reagentes, análises por espectrometria de massas e computacionais foram de R\$ 37.400. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Total de isolados MDR e de <i>Acinetobacter baumannii</i> MDR recebidos no LACEN/PR no período de janeiro de 2019 a março de 2021. Dados retirados do sistema GAL – LACEN/PR – Origem das amostras laboratoriais: Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.	27
Figura 2 – Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina B de <i>Acinetobacter</i> spp. recebidos no LACEN/PR no período de janeiro de 2019 a março de 2021. Dados retirados do sistema GAL – LACEN/PR – Origem das amostras laboratoriais: Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Método: Microdiluição em caldo. Legenda: Linha vermelha: ponto de corte para polimixina, segundo o BrCAST 2021.	28
Figura 3 – Diferença entre a estrutura química de (A) colistina e (B) polimixina B.	32
Figura 4 – Composição do lipopolissacarídeo contendo três subunidades principais, o antígeno O, um núcleo de oligossacarídeo e o lipídeo A.	33
Figura 5 – Mecanismo de ação das polimixinas, demonstrando a interação do fármaco com o LPS e o deslocamento de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , provocando a desestabilização do LPS e rompimento da membrana.	34
Figura 6 – Mecanismos de resistência à polimixina B e colistina em <i>Acinetobacter baumannii</i> . O primeiro envolve mutações no sistema de dois componentes (TCS, <i>two-component system</i>), regulado pelos genes <i>pmrA/pmrB</i> , levando à modificação do lipídeo A com adição de fosfoetanolamina (PEtN), que reduz a afinidade da colistina. O segundo mecanismo, mais comum, resulta da perda completa do LPS, causada por mutações nos genes <i>lpxA</i> , <i>lpxC</i> e <i>lpxD</i> , frequentemente associadas à inserção de elementos genéticos como IS <i>Aba1</i> e IS <i>Aba11</i>	36
Figura 7 – Esquema da técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). A amostra é incorporada em uma matriz ácida, formando um <i>spot</i> sólido após evaporação dos solventes. O espectrômetro de massas expõe o <i>spot</i> a feixes de laser UV, promovendo a liberação, vaporização e ionização dos analitos. Os íons gerados são acelerados por um campo elétrico, atravessam um tubo de voo sob baixa pressão e são detectados para análise da razão massa-carga (m/z).	43
Figura 8 – Espectrômetro de massas Orbitrap Fusion™ Lumos™ (Thermo Scientific, EUA), utilizado nesse trabalho, localizado no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná.	44
Figura 9 – Esquema das etapas de um experimento proteômico.....	45
Figura 10 – Fonte de ionização por <i>electrospray</i>	47
Figura 11 – Esquema geral dos analisadores do espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos.	49
Figure 12 – Ion chromatogram comparison of technical replicates of <i>Acinetobacter baumannii</i> resistant to polymyxin B.....	62

Figure 13 – DiagnoMass vs PatternLab PCA plots of polymyxin B resistant *A. baumannii* - This figure presents a side-by-side comparison of *A. baumannii* strains resistant and non-resistant to polymyxin B, as visualized through DiagnoMass and PatternLab. The upper panel displays a DiagnoMass-generated PCA scatterplot, with spectral clusters from peptides (identified or not) depicted as red (resistant) and green (non-resistant) dots, indicating a clear proteomic distinction between the strains. Conversely, the lower panel shows a PatternLab-generated plot, based solely on identified peptides, where the resistant and non-resistant strains are represented by green and light-brown dots, respectively, with no evident separation. 64

Figure 14 – Heatmap and Histogram of Spectral Clusters - This figure presents a heatmap of all bacterial samples analyzed in the study, generated using DiagnoMass. The heatmap visualizes the similarity in proteomic profiles between each pair of samples, with colour intensity indicating the degree of similarity. On the right, two bars represent the number of spectral clusters unique to each condition, i.e., the resistant (blue) and non-resistant (red) bacteria. The figure illustrates the significant differences in the proteomic profiles, especially the greater abundance in unique spectral clusters in the resistant condition, highlighting the presence of numerous discriminative and yet unidentified mass spectral clusters. The results underscore the potential of this overlooked data in understanding antibiotic resistance. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)..... 65

Figure 15 – Consensus Spectrum Illustration - The figure above presents a consensus spectrum, as provided by DiagnoMass, generated through the averaging of intensity values for all mass spectral peaks within a specific spectral cluster. The y-axis denotes relative intensity, while the x-axis represents the corresponding mass spectral bin number. This consensus spectrum provides a comprehensive representation of the spectral cluster's characteristic features. 66

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e dados das cepas estudadas.....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS E SÍMBOLO

ABC	Bicarbonato de sódio
ACN	Acetonitrila
AMS	Assembleia Mundial da Saúde
AMR	Resistência antimicrobiana (do inglês, <i>antimicrobial resistance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica (do inglês, <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ARGs	Genes de resistência antimicrobiana (do inglês, <i>antimicrobial resistance genes</i>)
ARI-1	<i>Acinetobacter</i> resistente ao imipenem
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (do inglês, <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
BR-GLASS	Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana - Brasil (do inglês, <i>Brazil - Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>)
Ca ²⁺	Cálcio
CATREM	Câmara Técnica de Resistência Microbiana/ANVISA
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doença (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
IC	Clones internacionais (do Inglês, <i>International Clones</i>)
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/Ministério da Saúde
CI	Ionização química (do inglês, <i>chemical ionization</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês, <i>collision-induced dissociation</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CMS	Colistimetato de sódio
CNCIRAS	Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos (do inglês, Carbapenem-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>)
BMD	Microdiluição em caldo (do inglês, <i>broth microdilution</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Ditiotreitol
EI	Ionização por elétrons (do inglês, <i>electron ionization</i>)

EptA	Fosfoetanolamina transferase lipídica A
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido (do inglês, <i>extended-spectrum beta-lactamase</i>)
ESI	Ionização por electrospray (do inglês, <i>electroSpray ionization</i>)
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (do inglês, <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
FA	Ácido fórmico
FAB	Bombardeamento rápido de átomo (do inglês, <i>fast atom bombardment</i>),
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAP	Plano de Ação Global (do inglês, <i>Global Action Plan</i>)
GGTES	Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde/ANVISA
GLASS	Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (do inglês, <i>Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>)
GVIMS	Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde/ANVISA
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massas em tandem (do inglês, <i>high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>)
HAP	Pneumonia adquirida no hospital (do inglês, <i>hospital-acquired pneumonia</i>)
IAA	Iodoacetamida
ICC	Instituto Carlos Chagas
ITU	Infecções do trato urinário
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LACEN-PR	Laboratório Central do Estado do Paraná
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (do inglês, <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>)
LOS	Oligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Quadrupolo de armadilha linear (do inglês, <i>linear trap quadrupole</i>)
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de massas por ionização com dessorção à laser assistida por matriz: tempo de voo (do inglês, <i>matrix-assisted laser desorption ionization time of flight - mass spectrometry</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multirresistente (do inglês, <i>multidrug-resistant</i>)

Mg ²⁺	Magnésio
MPT	Modificação pós-traducional
<i>m/z</i>	Razão massa-carga (do inglês, <i>mass-charge ratio</i>)
NDM	Nova Déli metalobetabactamase (do inglês, <i>New Delhi metallo β-lactamase</i>)
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês, <i>next generation sequencing</i>)
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (antiga denominação)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA-23	OXA-carbapenemase do tipo 23 (do inglês, <i>Oxa-carbapenemase type 23</i>)
PAN-BR	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos – Brasil
PAN-Serviços de Saúde	Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência aos Antimicrobianos nos Serviços de Saúde
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PBPs	Proteínas de ligação a penicilinas (do inglês, <i>penicillin-binding proteins</i>)
PCI	Prevenção e controle de infecção
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PDR	Panresistente (do inglês, <i>pandrug-resistant</i>)
PetN	Fosfoetanolamina
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
repPCR	Reação em cadeia da polimerase repetitiva palindrômica (do inglês, <i>repetitive element palindromic polymerase chain reaction</i>).
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TCS	Sistema de dois componentes (do inglês, <i>two component systems</i>)
UTI	Unidade de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
XDR	Extensivamente resistentes a medicamentos (do inglês, <i>extensively drug-resistant</i>)

RESUMO

Introdução: A rápida disseminação de bactérias multirresistentes (MDR) e panresistentes (PDR) destaca a importância crucial da vigilância da resistência antimicrobiana para orientar políticas de saúde pública, incluindo a necessidade de diagnósticos precisos e rápidos para a identificação de MDRs. O *Acinetobacter baumannii*, potencial patógeno causador de infecções nosocomiais, muitas vezes apresenta resistência aos antibióticos da classe dos carbapenêmicos, resultando em prolongamento da internação e riscos à eficácia do tratamento. As polimixinas são consideradas a última opção terapêutica para infecções por *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos (CRAB). A dificuldade em distinguir cepas sensíveis e resistentes às polimixinas pode ser superada por abordagens avançadas, como a proteômica. **Objetivo:** Desenvolver metodologia experimental e computacional baseada em proteômica para distinguir cepas de *Acinetobacter baumannii* sensíveis e resistentes às polimixinas. **Metodologia:** Foram analisadas 28 cepas de *Acinetobacter baumannii* – 14 sensíveis e 14 resistentes à polimixina B – obtidas do banco de cepas do LACEN-PR, isoladas entre 2018 e 2022. As cepas foram submetidas à extração de proteínas, que passaram por quantificação, digestão e quantificação dos peptídeos. Cada mistura peptídica foi submetida à cromatografia líquida seguida por espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), obtendo-se duas réplicas técnicas de cada amostra biológica. Os dados foram analisados utilizando-se os softwares *RawVegetable*, a fim de verificar a reprodutibilidade do experimento, *PatternLab for proteomics V*, na identificação de proteínas e peptídeos, e o *DiagnoMass*, para agrupamento espectral. **Resultados:** Foram identificadas 241 proteínas para ambos os conjuntos de cepas sensíveis e resistentes à polimixina. Desse total, foram observadas 151 proteínas exclusivas nas cepas resistentes, e uma proteína exclusiva para a condição suscetível. **Conclusões:** Os resultados indicaram que é possível distinguir as cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes das sensíveis baseando-se apenas nos espectros de massas gerados, sem a necessidade de espectros gerados previamente para fins de comparação. Apesar dos avanços, uma parte significativa dos espectros de massas permanece não caracterizada, com potencial de oferecer informações valiosas sobre modificações pós-traducionais e substituições de aminoácidos. Faz-se necessário o refinamento das ferramentas de análise proteômica para permitir uma melhor caracterização de proteínas potencialmente envolvidas em mecanismos de resistência à polimixina B.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias multirresistentes; proteômica *shotgun*; espectrometria de massas; resistência à polimixina.

ABSTRACT

Introduction: The rapid spread of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) bacteria highlights the crucial importance of antimicrobial resistance surveillance in guiding public health policies, including the need for accurate and rapid diagnostics for MDR identification. *Acinetobacter baumannii*, a potential pathogen responsible for nosocomial infection, often exhibits resistance to carbapenem-class antibiotics, leading to prolonged hospitalization and risks to treatment efficacy. Polymyxins are considered the last therapeutic option for infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB). The challenge in distinguishing polymyxin-sensitive and -resistant strains can be overcome through advanced approaches such as proteomics. **Objective:** To develop an experimental and computational methodology based on proteomics to distinguish *Acinetobacter baumannii* strains that are sensitive and resistant to polymyxins. **Methodology:** A total of 28 *Acinetobacter baumannii* strains – 14 polymyxin B-sensitive and 14 polymyxin B-resistant – were analyzed. These strains were obtained from the strain bank of LACEN-PR, isolated between 2018 and 2022. The strains underwent protein extraction, followed by quantification, digestion, and peptide quantification. Each peptide mixture was subjected to liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), generating two technical replicates for each biological sample. Data analysis was performed using RawVegetable to verify experiment reproducibility, PatternLab for Proteomics V for protein and peptide identification, and DiagnoMass for spectral clustering. **Results:** A total of 241 proteins were identified in both polymyxin-sensitive and -resistant strains. Among them, 151 proteins were exclusive to resistant strains, while only one protein was exclusive to the susceptible condition. **Conclusions:** The results indicate that it is possible to distinguish polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from sensitive ones based solely on the generated mass spectra, without the need for previously generated spectra for comparison. Despite these advances, a significant portion of the mass spectra remains uncharacterized, holding the potential to provide valuable insights into post-translational modifications and amino acid substitutions. Further refinement of proteomic analysis tools is required to allow for a better characterization of proteins potentially involved in polymyxin B resistance mechanisms.

KEYWORDS: multidrug-resistant bacteria; shotgun proteomics; mass spectrometry; polymyxin resistance.

RESUMO POPULAR

A disseminação rápida de superbactérias – ou seja, bactérias causadoras de graves infecções e resistentes ao tratamento com antibióticos – reforça a importância do monitoramento da comunicação rápida aos profissionais e gestores da área de saúde pública. Diagnosticar rapidamente bactérias resistentes é crucial na área da saúde, especialmente para o microrganismo *Acinetobacter baumannii*, que frequentemente é resistente a quase todos os antibióticos disponíveis, complicando os tratamentos hospitalares. As polimixinas são a última opção de antibióticos para tratar infecções multirresistentes por *Acinetobacter baumannii*, e distinguir cepas sensíveis e resistentes é um grande desafio. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método para classificar proteínas presentes nas bactérias deste grupo, resistentes e sensíveis às polimixinas. Foram usadas 14 amostras de *Acinetobacter baumannii* resistentes e 14 sensíveis à polimixina. As amostras passaram por vários processos para extrair proteínas e foram analisadas utilizando softwares específicos com recursos de inteligência artificial. A análise levou à identificação de proteínas que diferenciam as amostras resistentes das sensíveis, mas ressaltou a necessidade de abordagens adicionais. Mesmo com avanços, muitos perfis de proteínas permaneceram não identificados. Estes poderão fornecer informações valiosas sobre modificações em proteínas, cruciais para entender mecanismos de resistência. Além disso, o estudo permitiu visualizar a contribuição desse tipo de pesquisa para a compreensão da biologia da bactéria e ressaltou a necessidade de novos avanços nas ferramentas de análise.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	17
1.1.1	CENÁRIO GLOBAL	17
1.1.2	CENÁRIO NACIONAL	19
1.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	22
1.2.1	MORFOLOGIA	22
1.2.2	POTENCIAL PATOGÊNICO	22
1.2.3	EPIDEMIOLOGIA GERAL	24
1.2.4	SURTOS NO BRASIL	25
1.2.5	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
1.3	POLIMIXINAS	30
1.3.1	MECANISMOS DE AÇÃO DAS POLIMIXINAS	32
1.3.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS	35
1.3.3	MÉTODOS DE TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS	36
1.4	PROTEÔMICA	38
1.4.1	PROTEÔMICA <i>Shotgun</i>	39
1.5	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
1.5.1	MALDI-TOF MS - PRINCÍPIO DO MÉTODO	42
1.5.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	44
1.5.2.1	PROCEDIMENTO PADRÃO EM LC/MS-MS	45
1.5.3	IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i> (ESI)	46
1.5.4	ANALISADORES DE MASSAS QUADRUPOLO, LTQ E ORBITRAP	48
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVO GERAL	51
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3.1.1	Gerar bibliotecas espectrais de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes à polimixina B.	51
3.1.2	Gerar bibliotecas espectrais de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> susceptíveis à polimixina B.	51
3.1.3	Classificar os microrganismos com base no perfil de espectro de massas.	51
3.1.3	Realizar a análise computacional dos dados espectrais das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes e susceptíveis à polimixina B, utilizando inteligência artificial para identificar padrões e otimizar a interpretação dos resultados.	51
4	MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	CRITÉRIOS DE ESCOLHA DAS CEPAS	52

4.2	ARTIGO PUBLICADO	54
	CONCLUSÕES.....	71
	CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO I – CÓPIA DO ARTIGO PUBLICADO EM FORMATO PDF.....	86
	ANEXO II – AUTORIZAÇÃO DE USO DO ARTIGO NA COMPOSIÇÃO DA DISSERTAÇÃO	96

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

1.1.1 CENÁRIO GLOBAL

A evolução global da resistência antimicrobiana (AMR – do inglês, *antimicrobial resistance*) vem ocorrendo há algum tempo, deixando as autoridades de saúde cada vez mais preocupadas com a situação. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a AMR é classificada como a redução da eficácia de agentes antimicrobianos causada por um fenômeno natural, adaptação do microrganismo, ou, possivelmente, por pressão seletiva devido ao uso indiscriminado em humanos, animais e na agricultura. A AMR representa uma séria ameaça à saúde global, resultando em milhares de mortes por ano em todo o mundo. Os dados fornecidos pela OMS e outras fontes destacam a urgência de enfrentar esse problema de forma abrangente e coordenada (1).

A resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos é caracterizada como multirresistência, e reflete a capacidade de um microrganismo de resistir a múltiplos tipos de antimicrobianos. Essa resistência ocorre devido ao desenvolvimento de vários mecanismos fisiológicos pelos microrganismos para se defenderem contra os efeitos desses agentes. Isso representa um desafio significativo para a eficácia dos tratamentos médicos, uma vez que as infecções causadas por essas cepas tornam-se mais difíceis de serem controladas (2,3).

Em 2013, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos Estados Unidos publicou seu primeiro relatório nacional divulgando o crescente aumento da AMR e seus planos de ação para combater essa ameaça. Nesse relatório, dados apresentados indicavam que pelo menos 23.000 pessoas morriam ao ano por infecções bacterianas resistentes a antibióticos naquele país e 700.000 no mundo (4).

Em 2014, o economista Jim O'Neill, comissionado pelo então primeiro-ministro britânico David Cameron, elaborou um relatório baseado em dados e opiniões de especialistas na área de AMR, para o Public Health England, no qual afirmou que até 2050 o custo global dispendido com infecções por bactérias multirresistentes poderia alcançar US\$ 100 trilhões (1). Nesse mesmo relatório, O'Neill afirma que se a AMR não for combatida agora, até 2050 os óbitos relacionados às bactérias multirresistentes poderão ser impressionantes, superando os óbitos por neoplasias: a cada três segundos, uma pessoa morrerá, podendo atingir dez milhões de vítimas por ano (5).

Em maio de 2015, a OMS, em parceria com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO – do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), anteriormente denominada como “Aliança Tripartite” e hoje como “Aliança Quadripartite”, em função da expansão e da inclusão do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), publicou, a partir da Assembleia Mundial da Saúde (AMS), um endosso do Plano de Ação Global (GAP – do inglês, *Global Action Plan*) para combate à AMR. Destacava-se a importância de os países membros terem seu próprio plano de ação nacional, sinalizando um prazo de até maio de 2017 para sua elaboração (6).

Com a finalidade de reafirmar as pautas levantadas na AMS e cumprir as necessidades do GAP no combate à AMR, em setembro de 2016 realizou-se a “Reunião de Alto Nível das Nações Unidas sobre Resistência Antimicrobiana”, reunindo autoridades de todo o mundo. Os países que participaram da reunião assinaram uma declaração política para reafirmar o compromisso na batalha contra à AMR (7).

Antes mesmo de serem descritos os impactos da COVID-19, em 2019, Murray *et al.* estimaram um aumento significativo da AMR desde os últimos relatórios publicados pelo CDC e OMS, resultando em 1,27 milhão de óbitos atribuídos e 4,5 milhões de óbitos

associados à resistência antimicrobiana (8).

Em março de 2019 foi realizada uma reunião com os principais especialistas da Região da Américas para avaliar os avanços dos programas de Prevenção e Controle de Infecção (PCI). Destacou-se a importância de fortalecer esses programas disponibilizando verbas para recursos e contratações de especialistas na área da saúde (9).

Também em 2019, o CDC atualizou seus dados sobre a AMR, enfatizando o progresso de suas ações (10), e em 2022 divulgou um relatório especial sobre o impacto do COVID-19 sobre a AMR, indicando que, nos EUA, muito do progresso até então adquirido foi prejudicado. Entre as várias ameaças apontadas pelo CDC, o *Acinetobacter baumannii* destacou-se como um microrganismo de ameaça urgente, causando 8.500 mortes por ano em pacientes hospitalizados no país (11).

1.1.2 CENÁRIO NACIONAL

O Brasil foi um dos países signatários do acordo pautado na AMS e, a partir da publicação do GAP pela OMS, equipes do Ministério da Saúde, em conjunto com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e vários Ministérios (Meio Ambiente, Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ciência e Tecnologia, Educação e Cultura, entre outros), elaboraram o Plano de Ação Nacional (PAN-BR). As ações específicas da ANVISA, previstas no plano, tiveram início em 2018 com vigência de cinco anos (2018-2022), tendo enfoque em Saúde Única (One Health), como recomendado pela OMS. O principal objetivo foi garantir e manter o tratamento e prevenção de doenças infecciosas, investindo em medicamentos seguros, eficazes e de qualidade, sendo acessível a toda população e utilizados de forma responsável. O PAN-BR busca engajar uma variedade de setores, reconhecendo que a AMR é uma questão complexa que requer uma abordagem multifacetada. No âmbito da agricultura, pecuária e abastecimento, estabelecido pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as estratégias visam combater a AMR por meio de uma abordagem integrada e interdisciplinar. Destacando a implementação de sistemas de vigilância para monitorar o uso de antimicrobianos e o surgimento de resistência em animais de produção e produtos derivados, revisão e atualização das regulamentações sobre o uso de antimicrobianos em animais para garantir a conformidade com as melhores práticas, restrição e proibição de determinados antimicrobianos para reduzir a resistência, promoção de programas de capacitação para veterinários, produtores e profissionais do setor sobre o uso racional de antimicrobianos e os riscos da AMR, educação e conscientização de todos os envolvidos na cadeia de produção alimentar sobre práticas seguras e a importância do controle da AMR, pesquisa e desenvolvimento de alternativas ao uso de antimicrobianos, como probióticos, vacinas e práticas de manejo que reduzem a necessidade de antimicrobianos, implementação de boas práticas de produção para fortalecer a saúde animal sem o uso excessivo de medicamentos, melhorias nas práticas de biossegurança, manejo, nutrição e ambiente, aplicação de protocolos de biossegurança para minimizar a disseminação de patógenos (12). Apesar de todo esforço, muitas ações do PAN-BR não foram desenvolvidas devido ao período crítico enfrentado durante a pandemia da COVID-19, o que também dificultou, até o momento (julho de, 2024), a elaboração do novo documento que estava previsto para 2022.

Além disso, no ano de 2017, o Brasil aderiu ao programa “Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana” (GLASS), e, em 2018, iniciou seu próprio capítulo do programa, o BR-GLASS. Dados de 2018 foram compilados, oriundos da rotina de três laboratórios de microbiologia hospitalar com amostras procedentes de pacientes de 301 cidades brasileiras. O microrganismo mais preocupante foi o *Acinetobacter* spp., pois 81,4% dos isolados hospitalares desta bactéria eram resistentes ao meropenem (13).

Recentemente, a Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde

(GVIMS/GGTES/ANVISA) publicou uma nova versão do Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência aos Antimicrobianos nos Serviços de Saúde (PAN-SERVIÇOS DE SAÚDE), com vigência entre 2023 e 2027. O plano anterior (2017-2021), atingiu seus objetivos. O documento atual foi revisado pela Câmara Técnica de Resistência Microbiana (CATREM/ANVISA) e pela Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (CNCIRAS/ANVISA), e tem como objetivo geral continuar promovendo a implementação de estratégias para detecção, prevenção e redução da AMR nos serviços de saúde, separados por eixos, que são: melhorar a conscientização e a compreensão sobre a resistência aos antimicrobianos nos serviços de saúde, reforçar o conhecimento e a base científica por meio da vigilância de infecções e da resistência aos antimicrobianos nos serviços de saúde, reduzir a incidência de infecções em serviços de saúde com medidas eficazes de prevenção e controle, e promover o gerenciamento adequado do uso de antimicrobianos nos serviços de saúde (14) .

A disseminação rápida de bactérias resistentes a medicamentos destaca a importância crescente da vigilância da AMR para orientar decisões e abordar um problema prioritário de saúde pública (15). Com o crescente aumento das mortes relacionadas à AMR e projeções preocupantes para o futuro, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a OMS destacam a urgência de medidas efetivas por parte dos estados membros, recomendando o aprimoramento tanto dos métodos de tratamento quanto os de diagnóstico para detecção rápida de microrganismos multirresistentes (MDR – do inglês, *multidrug-resistant*) (16).

Com a pandemia do COVID-19, o cenário da AMR exacerbou a disseminação da AMR devido ao uso indiscriminado e incorreto de antimicrobianos no seu tratamento, destacando ainda mais a urgência de abordar esse desafio de forma proativa e eficaz (17–19).

1.2 *Acinetobacter baumannii*

1.2.1 MORFOLOGIA

Um dos microrganismos que mais causam infecções nosocomiais é o *Acinetobacter baumannii*, cocobacilo gram-negativo, não fermentador, aeróbio, pertencente à família *Moraxellaceae*, considerada uma bactéria oportunista predominante em unidades de terapia intensiva (UTIs) e em pacientes imunossuprimidos. Ele é responsável por causar pneumonia adquirida no hospital e associada à ventilação mecânica (HAP, PAV), bacteremia, meningite, infecção do trato urinário (ITU), e infecções de pele (20,21).

O *Acinetobacter baumannii* é frequentemente um patógeno MDR, causando doenças de difícil tratamento, devido à sua plasticidade genética que facilita a aquisição de genes de resistência a antibióticos por meio de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (22).

A espécie possui uma notável capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, como em superfícies e equipamentos médicos. Além disso, consegue persistir em ambientes com baixa umidade, o que facilita sua disseminação em unidades de saúde e aumenta a dificuldade de erradicação (23). Em 2017, a OMS publicou sua primeira lista de patógenos prioritários resistentes, na qual o *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB – do inglês, *carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*) foi incluído no grupo de prioridade 1, considerado crítico. Recentemente, o documento foi atualizado, mantendo o patógeno na mesma prioridade. A lista tem como objetivo incentivar os governos a investirem em pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para as espécies mais críticas (24–26).

1.2.2 POTENCIAL PATOGÊNICO

A classe de antibióticos carbapenêmicos já foi considerada a última opção terapêutica para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* MDR. No entanto, nos últimos

anos, houve aumento expressivo de isolados resistentes a essa classe, levando à aplicação clínica de polimixinas, uma antiga classe de antibióticos utilizada na década de 1960. Naquela época, essas drogas tiveram seu uso interrompido devido à sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Com o surgimento de cepas extensivamente resistentes a medicamentos (XDR), e até mesmo cepas pan-resistentes (PDR), ou seja, microrganismos resistentes a todas as classes de drogas antimicrobianas disponíveis no mercado, a colistina tem sido forçadamente utilizada pelos médicos no combate a essas infecções, como uma das únicas opções para tratamento de CRAB, agravando drasticamente este cenário (27,28). No entanto, cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes à colistina também vêm sendo evidenciadas mundialmente, permanecendo apenas o cefiderocol, um novo antibiótico da classe das cefalosporinas, como a única droga ativa (29).

O cefiderocol é um antibiótico que tem como alvo a aquisição de nutrientes pelas bactérias gram-negativas, agindo como um sideróforo sintético, que imita os sideróforos naturais das bactérias. Os sideróforos são moléculas que as bactérias secretam para capturar ferro do ambiente, um nutriente vital para seu crescimento. O cefiderocol é transportado ativamente para o periplasma bacteriano, inibindo a síntese da parede celular através da ligação às proteínas de ligação às penicilinas (PBPs – do inglês, *penicillin-binding proteins*), principalmente a PBP3, levando à morte bacteriana (30,31).

Contudo, uma pesquisa clínica de fase 3 com cefiderocol, randomizada, aberta, de grupo paralelo, centrada em patógenos responsáveis por infecções graves causadas por bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, conduzida em 95 hospitais distribuídos por 16 países na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, foi realizada com os participantes aleatoriamente designados em uma proporção de 2:1 (dois para um) para receber cefiderocol ou a melhor terapia disponível. Os resultados indicaram uma maior mortalidade por todas as causas em infecções por *Acinetobacter baumannii*, que apresentou

uma taxa de resistência de 50%. Esse achado pode estar relacionado à heterorresistência generalizada, fenômeno no qual uma mesma população bacteriana contém tanto células sensíveis quanto células resistentes ao antibiótico, sendo esse efeito particularmente relevante em isolados de CRAB, podendo contribuir para falhas terapêuticas e reforçar a necessidade de monitoramento rigoroso da resistência antimicrobiana. Tais evidências destacam os desafios enfrentados no desenvolvimento de terapias eficazes contra infecções causadas por cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii*. Entretanto, são necessários mais ensaios clínicos randomizados e estudos *in vivo* para fornecer uma compreensão mais abrangente da eficácia e segurança do uso de cefiderocol em infecções por *Acinetobacter baumannii* (32–34).

Apesar de não ser idealmente eficaz para todas as infecções por *Acinetobacter baumannii*, o cefiderocol mantém sua utilidade como antibiótico para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas (35). Porém, essa droga não está sendo comercializada no Brasil até o presente momento (junho de 2024).

1.2.3 EPIDEMIOLOGIA GERAL

O primeiro caso de CRAB foi relatado na Escócia em 1985, onde foi detectada a produção de ARI-1 (*Acinetobacter* resistente ao imipenem). Desde então, surgiram relatos de cepas em outras regiões da Europa, Ásia e Américas do Norte e do Sul, incluindo países como Espanha, Bélgica, Inglaterra, França, Hong Kong, Kuwait, Singapura, Argentina, Brasil e Cuba (36,37).

Em uma revisão publicada por Chagas et al. (38) em fevereiro de 2024, destacaram-se as taxas de CRAB no nível mundial e, mais especificamente, na América Latina. Essas taxas oscilaram globalmente, com variações significativas entre regiões. Uma análise com isolados de *Acinetobacter baumannii* em 13 países da região Ásia-Pacífico revelou uma

ampla variação na proporção de isolados resistentes, desde 2,8% no Japão, 6,5% na Austrália, até 88% na Coreia do Sul. Na Ásia e nas Américas, exceto no Japão e Canadá, a resistência parece ser um problema crítico, enquanto a Oceania e parte da Europa possuem taxas abaixo de 10%. Em áreas como o Mediterrâneo, Oriente Médio e norte da África, até 90% das cepas são resistentes aos carbapenêmicos. Na Europa, a vigilância da AMR de 2022 indicou uma variação ampla, com taxas de resistência que vão de menos de 1% em alguns países a mais de 50% em outros, especialmente no sul e leste do continente. Na América do Norte, entre 2013 e 2016, foram registradas taxas de ocorrência de isolados de *Acinetobacter baumannii* suscetíveis de 54,9% e 57,7% ao meropenem e imipenem, respectivamente. Comparando os períodos de 1997-2000 e 2013-2016, houve uma redução significativa na taxa de suscetibilidade ao meropenem, caindo de 88,8% para 54,9% naquela região. As taxas de ocorrência de CRAB entre *Acinetobacter baumannii* na América Latina estão entre as mais altas do mundo, chegando até 90% em alguns países e superando 50% em muitos outros. Esse número pode variar de 0 a 97,5% entre os isolados latino-americanos. Em conclusão, a revisão apontou uma taxa global de resistência ao meropenem de 64,4%, com as maiores porcentagens observadas na África/Oriente Médio, América Latina, Ásia/Pacífico Sul e Europa.

1.2.4 SURTOS NO BRASIL

O primeiro surto descrito mundialmente por CRAB aconteceu na cidade de Curitiba, Paraná, no ano de 1999. As cepas do surto eram provenientes de dois hospitais, tendo sido isoladas de oito pacientes. Desses, cinco foram a óbito (39).

A cepa produtora de New Delhi metallo β -lactamase (NDM) mais antiga do Brasil foi descrita retrospectivamente por Deglmann *et al.* em 2019 (40), referente a um isolado de 2012, do banco de cepas do Hospital Dona Helena, em Joinville-SC. O gene foi encontrado

em um *Acinetobacter pittii*. Contudo, a detecção da primeira cepa portadora do gene em *Acinetobacter baumannii* foi relatada em 2014 na urina de um paciente de 71 anos com doença respiratória obstrutiva, internado em um hospital em Londrina, Paraná. No septuagésimo dia de internamento, o paciente foi a óbito (41).

Em 2013, Cieslinski *et al.*, (42) verificaram a distribuição clonal de cepas de *A. baumannii* OXA-carbapenemase (OXA-23) em todo estado do Paraná, através de técnica de reação em cadeia da polimerase repetitiva palindrômica (repPCR – do inglês, *repetitive element palindromic polymerase chain reaction*). Foram analisadas 46 cepas de CRAB, isoladas de oito hospitais, localizados em quatro cidades diferentes durante 2009-2011; 100% das cepas eram portadoras do gene *bla*_{OXA-23}. O estudo identificou sete clones que se mostraram semelhantes a cepas de referência internacional. O *cluster* principal, denominado clone A, compreendeu 32 dos 46 isolados (69,6%), agrupados com o clone internacional (IC – do inglês, *international clone*) IC-4. O *cluster* B continha quatro isolados (8,7%), e agrupou com o IC-7; os *clusters* C (IC-4) e D (IC-5) apresentaram três isolados cada (6,5%), e o *cluster* E incluiu dois isolados (4,3%). Por sua vez, os isolados F e G exibiram um perfil único que não se associou a nenhuma dos IC. O estudo representou a primeira análise de epidemiologia molecular de CRAB no país, com isolados coletados de hospitais situados em diversas regiões de um mesmo estado.

Durante a primeira onda da pandemia de COVID-19, entre maio de 2020 a maio de 2021, Camargo *et al.* (43) observaram a rápida disseminação de uma variante emergente de CRAB, a IC-2, cepa considerada incomum no Brasil, responsável por um surto significativo em um hospital público no país. Foram recuperados 137 isolados para testes de sensibilidade a antibióticos, análise por PCR e tipagem molecular. Para análise mais aprofundada, o genoma completo do primeiro isolado recebido, foi sequenciado e analisado. No total, 76% dos pacientes apresentaram uma única variante da enzima OXA-23, do tipo IC-2. Todas as

amostras eram suscetíveis à polimixina B, mas mostraram uma alta resistência (>95%) a antibióticos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e beta-lactâmicos. Ao analisar o genoma, descobriu-se que o isolado representativo também carregava uma enzima chamada ArmA, uma metilase de RNAr 16S. Esta foi a primeira vez que a enzima foi detectada em *Acinetobacter baumannii* no Brasil.

Em agosto de 2021 a GVIMS/GGTES/ANVISA e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/Ministério da Saúde (CGLAB) divulgaram a nota técnica N° 05/2021, ressaltando o aumento logarítmico de infecções por CRAB durante a pandemia de COVID-19, no Brasil. O documento aponta dados do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) coletados entre 2018 e 2021, identificando aumento de 111% no envio de cepas MDR de hospitais de cinco estados durante os primeiros trimestres de 2019 e 2021. Os isolados de *Acinetobacter baumannii* apresentaram um aumento ainda mais expressivo, atingindo 130% durante o mesmo período (figura 1) (44). Em adição, 95,8% desses isolados exibiram resistência aos carbapenêmicos, conforme evidenciado por Kiffer *et al.*, em 2023 (45).

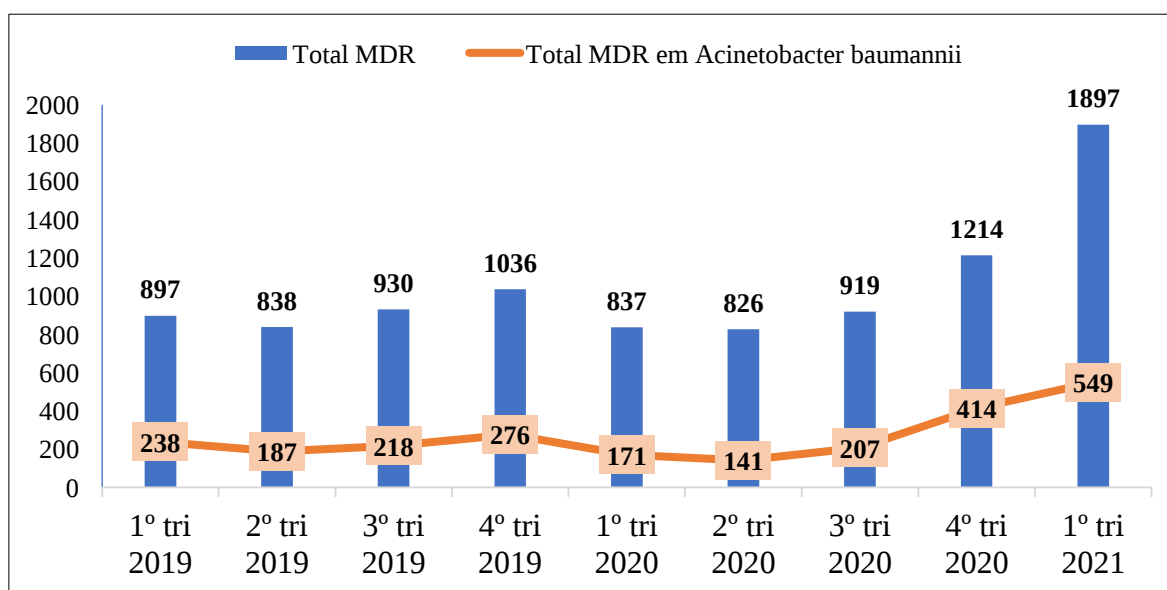


Figura 1 – Total de isolados MDR e de *Acinetobacter baumannii* MDR recebidos no LACEN/PR no período de janeiro de 2019 a março de 2021. Dados retirados do sistema GAL – LACEN/PR – **Origem das amostras laboratoriais:** Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Fonte: Adaptado de Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA N° 05/2021 (44).

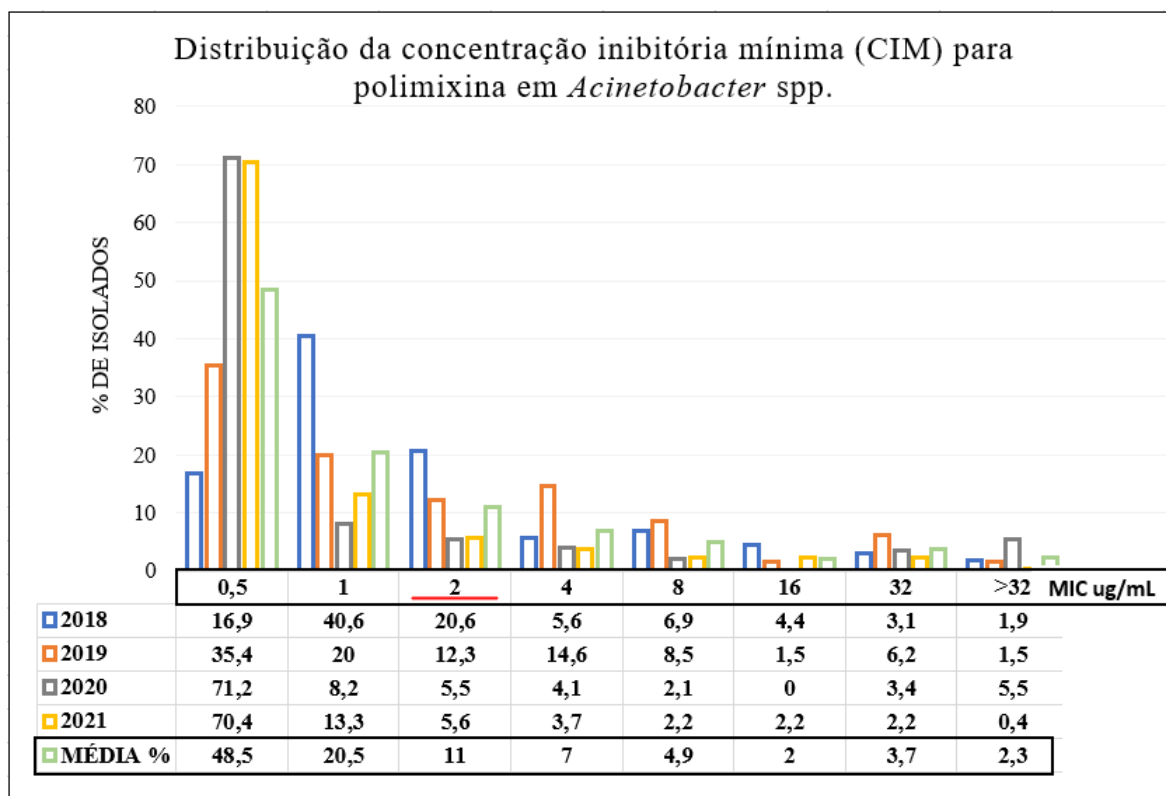


Figura 2 – Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) para polimixina B de *Acinetobacter* spp. recebidos no LACEN/PR no período de janeiro de 2019 a março de 2021. Dados retirados do sistema GAL – LACEN/PR – **Origem das amostras laboratoriais:** Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. **Método:** Microdiluição em caldo. **Legenda:** Linha vermelha: ponto de corte para polimixina, segundo o BrCAST 2021.

Fonte: Adaptado de Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 05/2021 (44).

Um estudo realizado em 2022, também com dados do LACEN-PR, mostrou aumento de 269% em isolados de CRAB provenientes de hospitais de cinco estados brasileiros (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) entre os anos de 2018 e 2021, destacando-se os antimicrobianos gentamicina, com resistência de 46% em 2018 para 79% em 2021, e resistência à amicacina, atingindo pico de 58% em 2021 (46).

Outro estudo retrospectivo evidenciando o aumento da resistência aos carbapenêmicos em ambientes hospitalares foi conduzido por Lucas *et al.* (47), em um hospital de ensino em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, entre janeiro de 2020 e dezembro de 2022. Foram analisados um total de 651 isolados bacterianos, identificados em culturas de aspirados traqueais. A identificação do complexo *Acinetobacter baumannii* foi realizada por análise macroscópica da colônia, microscopia de Gram e testes fenotípicos.

Acinetobacter baumannii foi a bactéria mais comum, representando 236 (36,25%) dos isolados bacterianos durante o período, com incidência de 65 (25%) em 2020, 106 (43,26%) em 2021 e 65 (44,52%) em 2022. Quanto à resistência aos carbapenêmicos (meropenem e imipenem) entre os isolados, 94,92% foram resistentes, com taxas semelhantes nos anos de 2020, 2021 e 2022. Das 5,08% sensíveis, 4,23% foram sensíveis a ambos os antibióticos.

Os dados deste estudo reforçam a preocupante alta taxa de resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de *Acinetobacter baumannii* em ambientes hospitalares, evidenciando a necessidade urgente de estratégias eficazes para o controle da disseminação dessas bactérias. A elevada resistência observada ao longo dos anos analisados destaca a importância da vigilância microbiológica contínua, do uso racional de antibióticos e da implementação de medidas rigorosas de prevenção e controle de infecções para conter a propagação de patógenos multirresistentes.

1.2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Acinetobacter baumannii*

Os mecanismos de aquisição de resistência pelo *Acinetobacter baumannii* são vários. Dentre eles, destacam-se: (a) produção de enzimas de inativação, um mecanismo comum, através do qual a bactéria é capaz de produzir beta-lactamases, enzimas que inativam antibióticos beta-lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas. Este é o mecanismo mais importante na resistência aos carbapenêmicos; (b) modificação de alvos: algumas cepas de *Acinetobacter baumannii* podem modificar seus alvos terapêuticos para impedir a ação dos antibióticos. Isso pode envolver alterações nas proteínas-alvo sobre as quais os antibióticos atuam, ou alterações no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, mecanismo este mais importante na resistência às polimixinas; (c) bombas de efluxo: a bactéria pode desenvolver sistemas de efluxo ativo, nos quais proteínas de transporte expulsam antibióticos para fora da célula bacteriana antes que eles possam exercer seu efeito; (d)

mudanças na permeabilidade da membrana: essas alterações podem reduzir a entrada de antibióticos nas células bacterianas, conferindo resistência; (e) reservatórios genéticos: o *Acinetobacter baumannii* pode adquirir genes de resistência horizontalmente, por meio de plasmídeos, integrons e outros elementos genéticos móveis (48,49).

Finalmente, há o fenômeno da resistência intrínseca, que é a capacidade natural que algumas espécies bacterianas possuem de resistir a certos antimicrobianos, mesmo na ausência de exposição prévia a esses agentes, sendo esse fenômeno geralmente atribuído a características estruturais ou fisiológicas específicas da bactéria, como a impermeabilidade da membrana celular, a presença de bombas de efluxo ou a ausência de alvos moleculares para a ação do antimicrobiano. (50).

É importante ressaltar que a resistência a antibióticos em *Acinetobacter baumannii* é multifatorial e pode envolver a interação de vários desses mecanismos em uma única cepa. Além disso, a rápida disseminação de cepas resistentes contribui para a urgência em se encontrar novas estratégias terapêuticas e medidas de controle de infecção (51).

1.3 POLIMIXINAS

As polimixinas, descobertas há mais de 60 anos, são polipeptídeos catiônicos cíclicos (48), pertencentes à família das polimixinas, reconhecidas pela sua potente ação antimicrobiana, frequentemente utilizadas como último recurso no tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas (52,53).

As únicas drogas da classe das polimixinas de uso clínico são, a polimixina B (uma mistura composta principalmente pelas polimixinas B3 e B6, mas que também pode conter componentes menores, como B1, B1-I e B2), e a colistina (polimixina E, composta principalmente por dois componentes principais, colistina A e B, também podendo conter aproximadamente 30 componentes menores) (54,55). Esses dois antibióticos compartilham

uma estrutura básica semelhante: ambos possuem um anel peptídico policatiônico e uma cauda de ácido graxo ligada ao peptídeo por uma ligação amida. O anel é completado pelos grupos alfa-amino e carboxil do resíduo diaminobutírico (Dab) na posição 4 (56).

A principal diferença entre a polimixina B e a colistina reside na estrutura primária, especificamente na posição 6. Na polimixina B, há a presença do aminoácido D-fenilalanina (D-Phe) nessa posição, enquanto na colistina há a ligação do aminoácido D-leucina (D-Leu) na mesma posição, conforme mostrado na figura 3. Essa diferença estrutural entre a polimixina B e a colistina pode ter impacto significativo nas propriedades dessas moléculas, como:

- a) Forma de administração.** A colistina é administrada como um pró-fármaco na forma de colistimetato de sódio (CMS), que precisa ser convertido em polimixina E ativa no organismo. Já a polimixina B é administrada diretamente na forma ativa.
- b) Meia-vida.** A colistina possui uma meia-vida mais longa porque precisa ser convertida na forma ativa, tornando seu efeito mais prolongado, mas com início de ação mais lento. A polimixina B, por estar na forma ativa, tem uma meia-vida menor, mas ação mais rápida.
- c) Penetração tecidual.** A polimixina B tem melhor penetração nos tecidos, especialmente no pulmão e no sistema nervoso central, devido a sua maior lipofilicidade. A colistina tem uma distribuição mais limitada devido à sua conversão a partir do CMS.
- d) Excreção e eliminação.** A polimixina B é eliminada principalmente por metabolismo hepático, enquanto a colistina é eliminada principalmente pelos rins.
- e) Eficácia contra bactérias.** Ambas têm espectros similares contra bacilos gram-negativos multirresistentes, mas a polimixina B pode ter melhor desempenho em alguns casos devido à sua forma ativa.
- f) Toxicidade.** A polimixina B tende a ter menos nefrotoxicidade, pois não é excretada primariamente pelos rins como a colistina. No entanto, ambas possuem risco de neurotoxicidade para as células humanas, especialmente em tecidos sensíveis como os pulmões, rins e sistema nervoso.
- g) Uso clínico.** A colistina é mais usada para infecções urinárias devido à sua excreção renal, enquanto a

polimixina B é preferida para infecções sistêmicas devido à sua melhor penetração tecidual. (56–58).

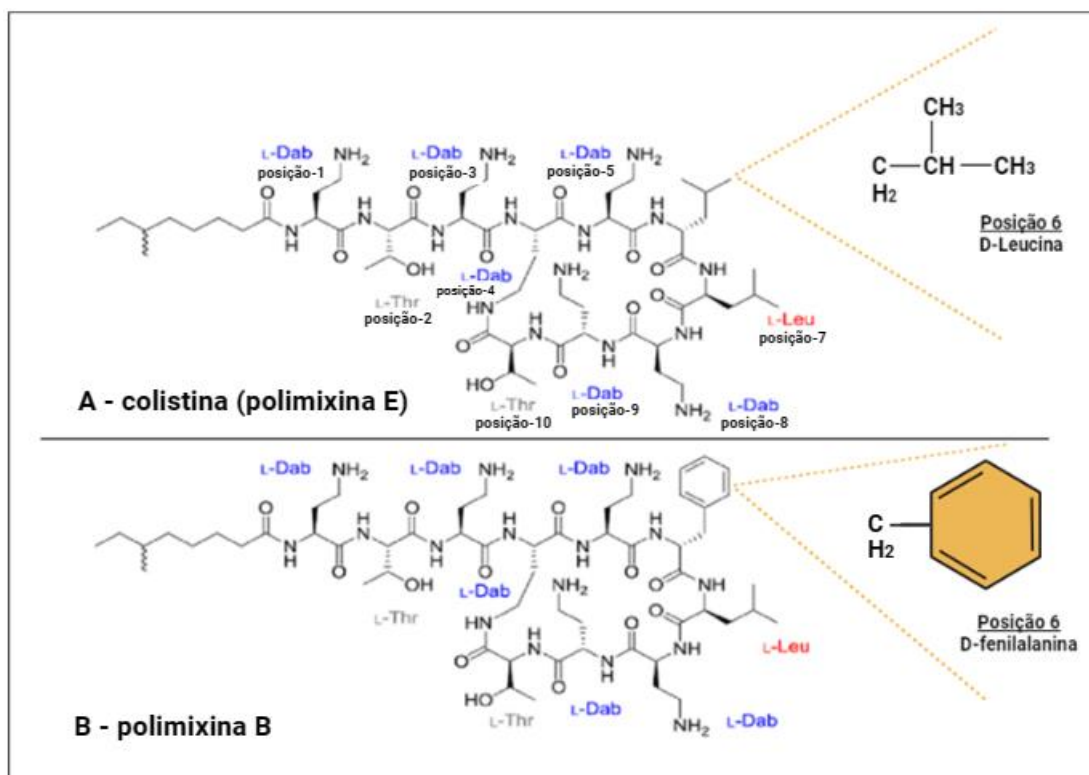


Figura 3 – Diferença entre a estrutura química de (A) colistina e (B) polimixina B.
Fonte: Adaptado de Kinoshita *et al.*, 2018 (58).

1.3.1 MECANISMOS DE AÇÃO DAS POLIMIXINAS

A alta afinidade das polimixinas ao LPS é uma característica importante que as torna valiosas no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, especialmente aquelas que se tornaram resistentes a outros antibióticos (59). A estrutura do LPS, localizado na face extracelular da membrana externa, pode variar entre diferentes espécies bacterianas e até mesmo dentro de uma mesma espécie, o que pode influenciar a susceptibilidade dessas bactérias às polimixinas. A camada de LPS mais tipicamente inclui o lipídeo A, uma cadeia de oligossacarídeos (LOS) e uma cadeia de antígeno O específica, como apresentado na figura 4 (60).

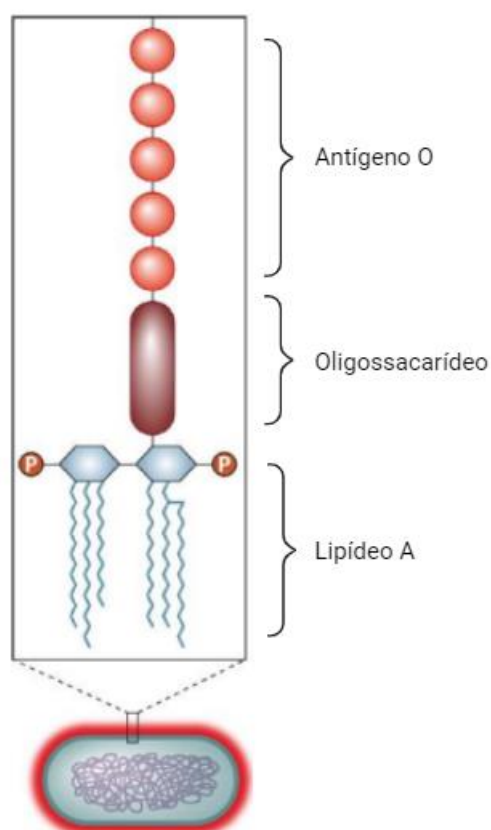


Figura 4 – Composição do lipopolissacarídeo contendo três subunidades principais, o antígeno O, um núcleo de oligossacarídeo e o lipídeo A.

Fonte: Adaptado de Paczosa *et al.*, 2016 (60).

O lipídeo A é a porção do LPS que está ancorada na membrana externa da bactéria e que desempenha um papel crucial na estabilização do LPS. Essa ancoragem ocorre devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o grupo fosfato do lipídeo A e os cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} presentes na estrutura da membrana (61).

As polimixinas possuem cargas catiônicas em sua porção polipeptídica, que são capazes de se ligar eletrostaticamente ao LPS. Essa ligação é facilitada pela interação da cauda lipídica das polimixinas com os ácidos graxos do lipídeo A. Quando as polimixinas se ligam aos resíduos de fosfato do lipídeo A, que possuem carga negativa, ocorre o deslocamento dos íons magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), responsáveis pela estabilização da membrana externa. Esse deslocamento rompe as interações que mantêm a organização dos lipídios, permitindo que as polimixinas se intercalem entre as moléculas lipídicas adjacentes.

Esse processo desorganiza a estrutura da membrana, reduzindo sua estabilidade e comprometendo sua integridade (54,62). Como consequência, a membrana perde sua capacidade de atuar como barreira seletiva de permeabilidade, tornando-se mais suscetível ao influxo descontrolado de substâncias (63).

Com a ruptura dessa barreira, ocorre o extravasamento de proteínas periplasmáticas e a entrada de moléculas que antes não conseguiam atravessar a membrana externa de maneira eficiente. Além disso, o deslocamento dos cátions divalentes e o aumento da permeabilidade facilitam a penetração das próprias moléculas de polimixina, permitindo que alcancem o periplasma e atinjam a membrana citoplasmática (figura 5) (64,65). A capacidade das polimixinas de ultrapassar a membrana externa e atingir camadas internas da célula bacteriana é essencial para sua ação antimicrobiana. Isso possibilita a interferência em processos celulares vitais, levando, eventualmente, à morte bacteriana.

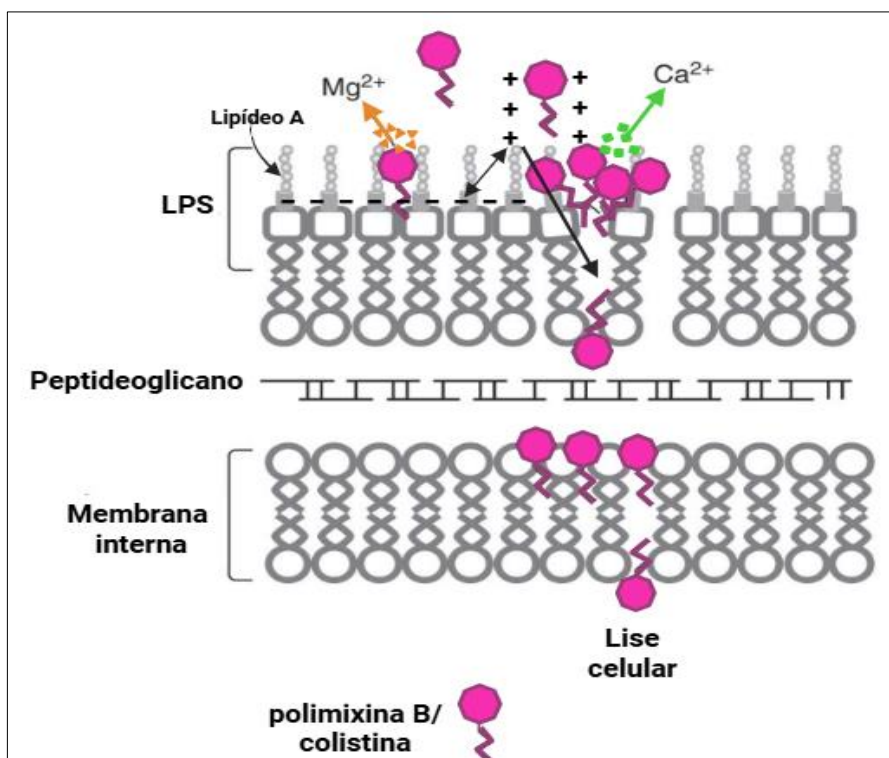


Figura 5 – Mecanismo de ação das polimixinas, demonstrando a interação do fármaco com o LPS e o deslocamento de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , provocando a desestabilização do LPS e rompimento da membrana. (Ver detalhes da descrição do mecanismo no texto).

Fonte: Adaptado de Trimble *et al.*, 2016 (61).

1.3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

O primeiro mecanismo de resistência envolve mutações no sistema de dois componentes (TCS – *Two-Component System*), um sistema regulador bacteriano composto pelos genes *pmrA* e *pmrB*. Esse sistema controla a expressão de genes que modificam a estrutura do lipídeo A, que é o alvo inicial da colistina. Quando ocorrem mutações em *pmrA* ou *pmrB*, a bactéria pode ativar a expressão da enzima fosfoetanolamina transferase lipídica A (EptA), codificada pelo gene *pmrC*. Essa enzima catalisa a adição de fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A, especificamente nas posições 1 ou 4'-fosfato. Essa modificação altera a carga elétrica da membrana externa, reduzindo a interação da colistina com o lipídeo A do LPS e, conseqüentemente, conferindo resistência ao antibiótico. As mutações envolvidas na resistência podem incluir *indels* (inserções ou deleções) e pequenas alterações no locus *pmr*, especialmente no gene *pmrB*, que é o mais frequentemente mutado em *Acinetobacter baumannii*. Esse padrão de mutação é semelhante ao observado em enterobactérias, reforçando a importância desse sistema na adaptação bacteriana à presença da colistina (66–68).

O segundo mecanismo, mais comum, é a perda completa do LPS causada por mutações nos três primeiros genes envolvidos na biossíntese do lipídio A: *lpxA*, *lpxC* e *lpxD*. Sequências de inserção (IS – do inglês, *insertion sequence*), como IS *Aba11* e elementos semelhantes, inativam os genes *lpxC* e *lpxA* em isolados clínicos resistentes à colistina. Estudos subsequentes mostraram que a inserção de IS *Aba1* ou IS *Aba11* no gene *lpxC* é um evento frequente nesse padrão de resistência em *Acinetobacter baumannii*. Uma região específica do gene *lpxC* (entre os nucleotídeos 321-420) parece ser um ponto comum de integração de ISs, indicando um possível *hot point* para mutações associadas à resistência. (69–71).

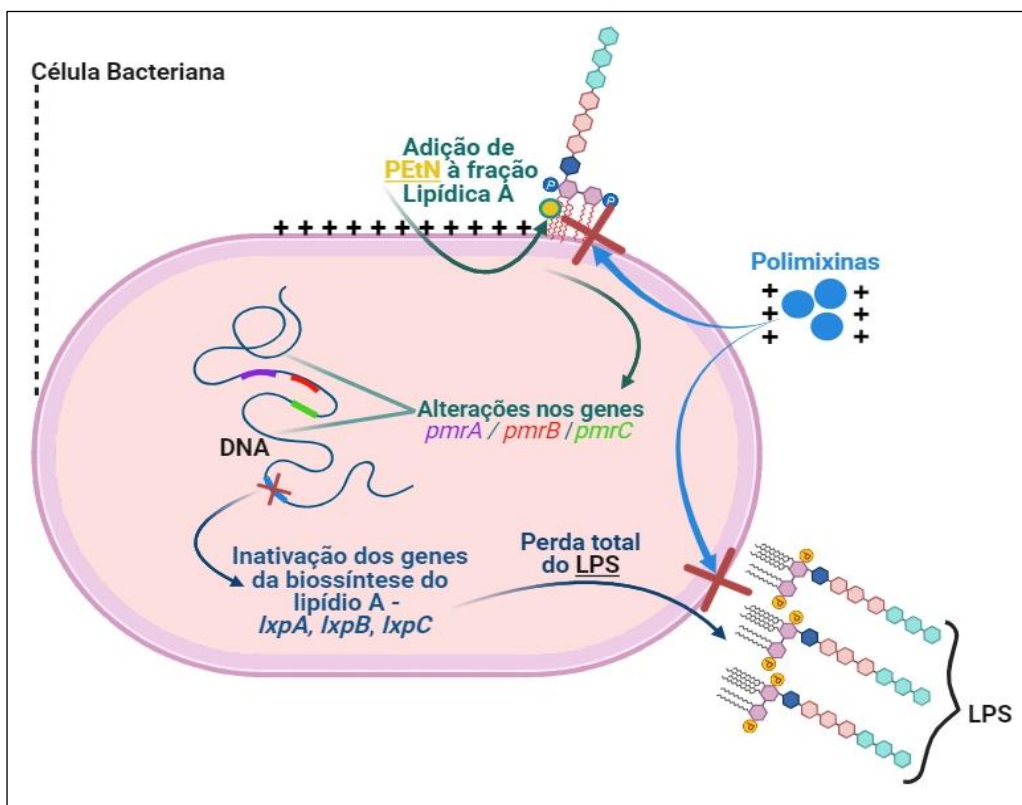


Figura 6 – Mecanismos de resistência à polimixina B e colistina em *Acinetobacter baumannii*. O primeiro envolve mutações no sistema de dois componentes (TCS, *two-component system*), regulado pelos genes *pmrA/pmrB*, levando à modificação do lipídeo A com adição de fosfoetanolamina (PEtN), que reduz a afinidade da colistina. O segundo mecanismo, mais comum, resulta da perda completa do LPS, causada por mutações nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD*, frequentemente associadas à inserção de elementos genéticos como *Aba1* e *IS Aba11*.

Fonte: Criado pelo autor com BioRender.com.

Um terceiro mecanismo de resistência à colistina envolve a transmissão por plasmídeos contendo o gene *mcr-1* e suas variantes. O gene *mcr-1* codifica uma transferase de PetN, que adiciona PEtN a um fosfato no lipídeo A (72). Entretanto, de acordo com Pillionetto (comunicação pessoal, 2024), um estudo de sete anos no LACEN-PR demonstrou a baixa prevalência deste gene na região.

1.3.3 MÉTODOS DE TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS POLIMIXINAS

Atualmente, existem cinco métodos disponíveis para realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Para as polimixinas, o método de microdiluição em caldo (BMD – do inglês, *broth microdilution*) é o único recomendado pelos comitês internacionais de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (BrCAST/EUCAST e CLSI), sendo

considerado o padrão ouro. No entanto, este método requer atenção rigorosa e um período de incubação prolongado, muitas vezes de até 24 horas. Outros métodos, como disco difusão, métodos automatizados, fitas de gradiente de concentração e diluição em ágar não devem ser utilizados, pois apresentam altas taxas de erros e resultados de falsos sensíveis, ou seja, indicando que uma determinada cepa bacteriana é suscetível à polimixina, quando, de fato, a bactéria é resistente a esse antibiótico (73,74).

Neste contexto, foram desenvolvidos métodos alternativos de triagem para detectar resistência à colistina, como o tubo de triagem de colistina, método que envolve a utilização de tubos contendo diferentes concentrações do antibiótico. No entanto, o método apresentou baixa sensibilidade e especificidade em isolados de não fermentadores, como o *Acinetobacter baumannii*, sendo mais eficaz e suscetível para *Enterobacterales* (75).

Outro método que avalia a sensibilidade a antimicrobianos é o drop-test, no qual uma única gota de solução eluída com disco de colistina é aplicada sobre uma cultura bacteriana. Após a incubação, observa-se se ocorreu ou não crescimento bacteriano ao redor do disco, e a presença de zona de inibição de qualquer diâmetro é considerada susceptibilidade ao antibiótico e ausência de zona de inibição, resistência. Essa técnica pode apresentar taxa de erros, como erros maiores (falsos resistentes) e erros muito maiores (falsos sensíveis) devido a falta de padronização; precisão limitada, que inclui fatores como quantidade de antibiótico aplicada e concentração da cultura bacteriana; interpretação subjetiva; e limitação na detecção de resistência de baixo nível (76).

Em 2022, Becker e Pilonetto (77) desenvolveram o teste Blue-Poli, uma adaptação do método de eluição em disco combinado com um método colorimétrico. O método utiliza azul de bromotimol como indicador de pH, que muda de ciano escuro para amarelo, proporcionando uma leitura mais clara. O teste foi validado com 115 cepas, das quais 55 (47,8%) eram suscetíveis e 60 (52,2%) resistentes à polimixina, demonstrando uma taxa de

100% de sensibilidade, especificidade e precisão na detecção de resistência à colistina em *Enterobacterales*. O teste não foi validado para uso em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, não sendo portanto, indicado para detectar resistência nessas espécies.

Uma abordagem inovadora, que permite a detecção rápida de alterações na fração lipídica A das bactérias e que está relacionada à resistência da polimixina, é o teste rápido MALDIxin, método baseado em espectrometria de massas por ionização com dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS – do inglês, *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*), que analisa diretamente bactérias intactas em um período de 15 minutos. Durante a análise, o espectrômetro de massa identifica padrões de massas específicos associados à presença de modificações no lipídio A. Embora seja um método novo e moderno, há desafios associados à sua implementação e interpretação dos dados espectrais (78).

Nesse cenário, o desenvolvimento de técnicas confiáveis, acessíveis e práticas para a detecção de resistência à polimixina é crucial, dada a importância desse antibiótico no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, especialmente aquelas resistentes a vários antibióticos.

1.4 PROTEÔMICA

A proteômica é descrita como uma ciência multidisciplinar que integra princípios da biologia molecular, bioquímica, bioinformática e espectrometria de massas. Um de seus objetivos é caracterizar sistemas biológicos através do perfil de proteínas expressos no tempo e no espaço. Métodos em proteômica são capazes de identificar e quantificar proteínas em larga escala e, por isso, têm ótimo potencial de serem utilizados na análise de diversos processos biológicos (79). Por exemplo, *in vitro*, destacam-se as aplicações no estudo das

respostas de células em cultura a fármacos, alterações do meio ou estímulos externos; *in vivo*, a caracterização de biomarcadores, na medicina personalizada para auxiliar diagnóstico precoce, prognóstico de doenças e a geração de conhecimento, no nível molecular, do comportamento de sistemas biológicos (80).

Estudos recentes têm associado de forma crescente o perfil de modificações pós-traducionais à patogenicidade dos microrganismos. Essas modificações covalentes ocorrem após a síntese da proteína e desempenham um papel significativo na capacidade de resistência e virulência dos microrganismos. Perfis como estes não podem ser avaliados pelas tecnologias de sequenciamento, bem como por métodos moleculares envolvendo análise de DNA/RNA (p. ex.: qPCR), destacando a necessidade de abordagens alternativas, como a espectrometria de massas (MS), para compreender e caracterizar adequadamente essas modificações (81–84).

1.4.1 PROTEÔMICA *Shotgun*

Dentre as técnicas proteômicas, a proteômica *shotgun* é considerada de estado-da-arte. Resumidamente, nesta técnica, o conteúdo proteico de um digesto de mistura complexa (por ex: lisado celular) é analisado utilizando cromatografia líquida em nano-fluxo diretamente acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Geralmente, os experimentos objetivam a identificação do conteúdo proteico, utilizando para isso ferramentas de busca em conjunto com um banco de dados de sequências de proteínas do respectivo organismo (85).

A proteômica *shotgun* foi desenvolvida pelo grupo do Dr. John R. Yates, em 1999, e aplicada primeiramente na identificação e caracterização de todas as proteínas presentes em um lisado de leveduras, sem a necessidade de purificar cada componente proteico, tendo seu uso rapidamente disseminado para todos os tipos de amostras complexas (86).

A análise proteômica *shotgun* requer a digestão prévia da amostra proteica em peptídeos por meio de uma enzima com sítios de clivagens conhecidos, como a tripsina, que cliva ligações peptídicas formadas após resíduos de lisina e arginina. Os peptídeos gerados são separados por cromatografia líquida em nano-fluxo acoplada diretamente ao espectrômetro de massas. O processo termina com a análise de milhares de espectros de massas obtidos de cada amostra com a ajuda de programas específicos para esses tipos de dados, como o *PatternLab for proteomics V* e o *DiagnoMass* (87).

Existe uma abordagem proteômica que visa classificar amostras biológicas, como para a identificação bacteriana, sem realizar a identificação das proteínas presentes. Estes experimentos tipicamente utilizam MS do tipo MALDI-TOF para se obter um conjunto de espectros representativos de cada tipo de organismo, chamado de classe. Para isso, são selecionados picos espectrais bem discriminados para aplicação de técnicas de aprendizado de máquina, utilizando classificadores como *bayesianos* ou máquinas de vetores de suporte. Esses, resolvem problemas de classificação, ou seja, preveem a classe de uma nova observação com base em dados de treinamento previamente identificados (79).

Espera-se que para uma amostra não identificada ou indeterminada, a inteligência artificial seja capaz de apontar a que classe, isto é, a qual espécie a amostra desconhecida pertence. Isso pode ser feito com base em padrões identificados durante o treinamento do modelo. Uma das vantagens desta técnica está relacionada à capacidade do modelo de aprendizado de máquina em aprender padrões diretamente dos dados fornecidos, sem depender de um banco de dados de sequências pré-existentes ou conhecimento detalhado sobre modificações pós-traducionais (88). Isso pode ser particularmente útil quando lidamos com organismos pouco estudados ou quando não temos acesso a informações detalhadas sobre suas sequências genéticas.

A proteômica é uma ferramenta poderosa e os avanços constantes em tecnologias e

metodologias estão superando muitos dos desafios antes encontrados, permitindo uma compreensão mais profunda dos processos biológicos em nível de proteína. Considerando-se a complexidade na identificação de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes às polimixinas, essas metodologias tornam-se potencialmente promissoras.

1.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massas é um instrumento analítico que converte moléculas neutras em íons na forma gasosa e os separa com base em sua razão massa-carga (m/z). A plataforma básica de análise consiste em uma fonte ionizante, um ou mais analisadores e detectores (89–91). Na década de 1970, a espectrometria de massas (MS – do inglês, *mass spectrometry*) começou a ser usada na identificação de microrganismos, e, a partir de 1987 desenvolveu-se a capacidade de ionizar grandes moléculas por laser, utilizando uma matriz de partículas de cobalto e glicerol. Esse avanço originou tecnologias como o MALDI-TOF, que revolucionou a análise de sistemas biológicos complexos, como as bactérias (92,93). Hoje, o uso dessas plataformas para identificação de isolados bacterianos já é rotina em vários laboratórios clínicos, sendo uma ferramenta de diagnóstico rápido, gerando resultado em alguns minutos, além de ser de alta sensibilidade e de baixo custo em relação a outros métodos (94).

Essa tecnologia gera impressões digitais de espectros de massas que funcionam como assinaturas exclusivas para cada microrganismo, proporcionando uma identificação precisa nos níveis de gênero e espécie. Os espectros gerados são compostos pelos picos das proteínas ribossômicas detectadas. Essas proteínas são altamente conservadas ao longo da evolução e apresentam características distintivas para cada *táxon*. A tecnologia MALDI-TOF MS destaca-se pela sua capacidade de caracterizar rapidamente microrganismos com base nessas assinaturas proteicas (95,96).

Porém, estas plataformas possuem limitações na identificação de novos isolados, sendo necessário haver um banco de dados espectral cadastrado contendo as impressões digitais de massas de peptídeos das novas cepas (97).

1.5.1 MALDI-TOF MS - PRINCÍPIO DO MÉTODO

A técnica de ionização e dessorção a laser assistida por Matriz (MALDI) é um método analítico que permite a ionização de compostos químicos para a determinação de suas razões massa-carga (m/z). O processo inicia com a incorporação da amostra em uma matriz ácida; subsequentemente, os solventes são evaporados, culminando na formação de uma co-cristalização da amostra e a matriz, resultando em um depósito sólido referido como 'spot'. A composição da matriz varia conforme a biomolécula a ser analisada. Uma lâmina contendo os *spots* é inserida no espectrômetro de massas e exposta a feixes de laser ultravioleta (UV) (98–100). A interação da energia do laser com o *spot* promove a liberação, vaporização e ionização dos analitos. Este processo envolve a transferência de carga da matriz para as moléculas de interesse resultando na geração de cátions. Os íons são acelerados por campos elétricos e direcionados através de um tubo de voo, operando em condições de baixa pressão (quase vácuo), até um detector, onde os sinais são registrados e analisados (Figura 7) (96,101).

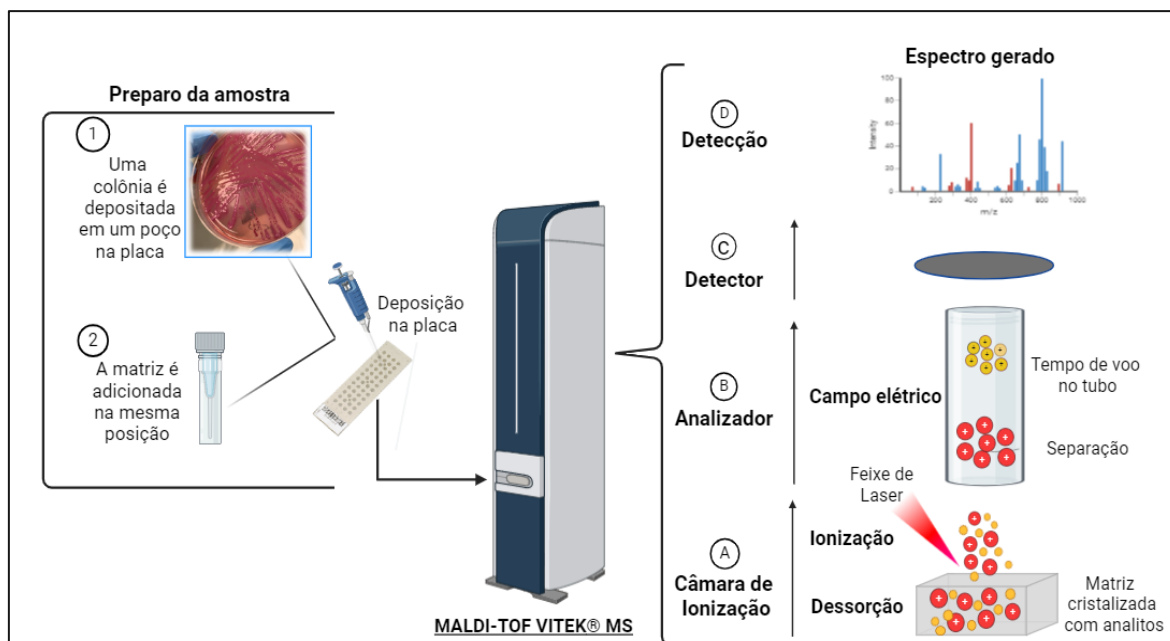


Figura 7 – Esquema da técnica de Ionização/Dessorção a Laser assistida por Matriz (MALDI). A amostra é incorporada em uma matriz ácida, formando um spot sólido após evaporação dos solventes. O espectrômetro de massas expõe o spot a feixes de laser UV, promovendo a liberação, vaporização e ionização dos analitos. Os íons gerados são acelerados por um campo elétrico, atravessam um tubo de voo sob baixa pressão e são detectados para análise da razão massa-carga (m/z).

Fonte: Criado pelo autor com BioRender.com.

No MALDI-TOF/MS, a frequência de laser de 50 Hz é utilizada para ionizar as amostras. Os íons gerados são acelerados em direção ao detector, onde a razão m/z dos íons é calculada com base no tempo de voo (TOF), com os íons menores atingindo o detector em menor espaço de tempo. Os íons com diferentes m/z são separados por TOF, resultando em um espectro de massas caracterizado pela razão m/z e pela intensidade dos íons. O cálculo da massa de cada íon é proporcional à raiz quadrada de sua razão m/z , com picos geralmente entre 2000 e 20.000 m/z , representados em modo linear positivo (96,97,102). Após a obtenção dos perfis de m/z , os dados são processados. Em seguida, os perfis obtidos são comparados com perfis conhecidos em bases de dados de espectros de massas, que contêm informações sobre compostos já caracterizados. Essa comparação permite a identificação de moléculas presentes na amostra testada. Os espectros gerados são então interpretados para identificar e quantificar os compostos. Por fim, a comparação com a base de dados ajuda a confirmar a identidade dos biomarcadores e a entender suas possíveis funções biológicas.

(103).

1.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

A aplicação da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS – do inglês, *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) é uma ferramenta valiosa para a análise de diversas substâncias e peptídeos não ribossômicos em meios complexos, como meios de cultivo (Figura 8). Enquanto a cromatografia líquida separa cada composto da amostra, o espectrômetro de massas fornece a razão m/z de cada composto ionizado que emerge da coluna cromatográfica e atinge o espectrômetro. Além disso, é possível obter informações sobre o tempo de retenção de cada íon monoprotonado. O espectrômetro também permite a fragmentação controlada dos íons desejados, facilitando a identificação estrutural com base em padrões de fragmentação (104).



Figura 8 – Espectrômetro de massas Orbitrap Fusion™ Lumos™ (Thermo Scientific, EUA), utilizado nesse trabalho, localizado no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná.

1.5.2.1 PROCEDIMENTO PADRÃO EM LC/MS-MS

O processo inicia com a hidrólise das proteínas para gerar uma mistura de peptídeos. Esses peptídeos são então separados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - do inglês, *high performance liquid chromatography*). Após essa etapa, o próximo passo é a análise por MS. O processo envolve a ionização dos peptídeos, a aquisição de um espectro completo (varredura), a seleção de íons precursores específicos detectados, a fragmentação e a aquisição de MS/MS. Os dados resultantes são processados para quantificar diferentes espécies e/ou determinar a sequência de aminoácidos dos peptídeos por meio de busca em banco de dados (figura 9) (104).

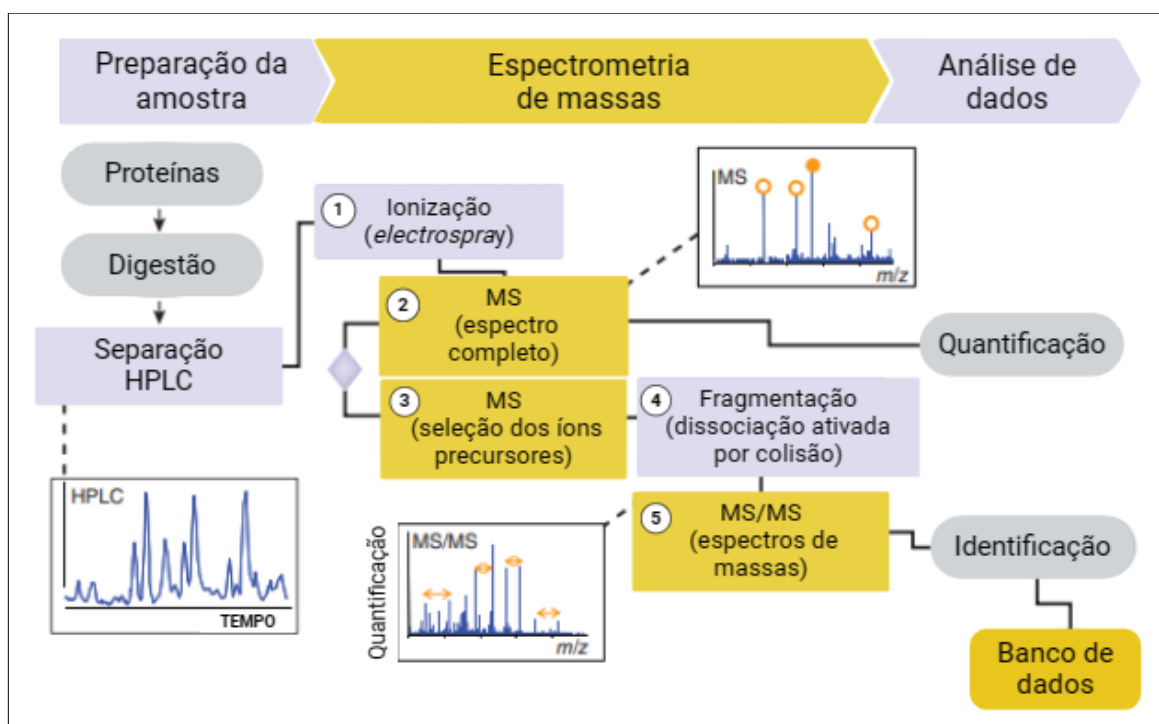


Figura 9 – Esquema das etapas de um experimento proteômico.

Fonte: Adaptado Domon B, *et al.*, 2010 (104).

Existem várias técnicas de ionização, cada uma com suas vantagens e aplicações específicas. Entre as mais comumente utilizadas, estão a ionização por elétrons (EI - do inglês, *electron ionization*) (105), ionização química (CI - do inglês, *chemical ionization*) (106), bombardeamento rápido de átomo (FAB - do inglês, *fast atom bombardment*) (107),

ionização por *electrospray* (ESI - do inglês, *electrospray ionization*) (108), e ionização química a pressão atmosférica (APCI – do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*) (109).

A escolha de cada técnica de ionização depende do tipo de amostra, das características do analito e dos objetivos da análise. O método de ionização empregado neste estudo foi a ESI.

1.5.3 IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (ESI)

A descoberta de Yamashita e John B. Fenn, em 1984, sobre a aplicabilidade da fonte de *electrospray* como um método de ionização suave representou um marco significativo na história da espectrometria de massas (MS). Esse método, amplamente empregado em proteômica, revolucionou a análise de biomoléculas, permitindo a ionização de compostos biológicos com mínima degradação (110). A técnica foi reconhecida com a concessão do Prêmio Nobel de Química em 2002 aos seus criadores, evidenciando o seu impacto no campo. A ESI facilita a transferência e ionização de analitos da fase líquida para a fase gasosa, viabilizando a análise de macromoléculas biológicas como proteínas, ou até mesmo de peptídeos e ácidos nucleicos, preservando a sua estrutura e integridade (108).

O método envolve a dessolvatação gradual das moléculas em temperaturas tipicamente entre 15°C e 80°C, sendo ideal para análise de espécies não voláteis e estudos de especiação (111). O uso de um solvente volátil, juntamente com o nano-fluxo, é aspecto fundamentais na técnica. Essas características garantem a eficácia da transição do analito da fase líquida, sob pressão atmosférica, para a fase gasosa, direcionando-os para o analisador de massas (112). A Figura 10 ilustra um esquema geral de ESI.

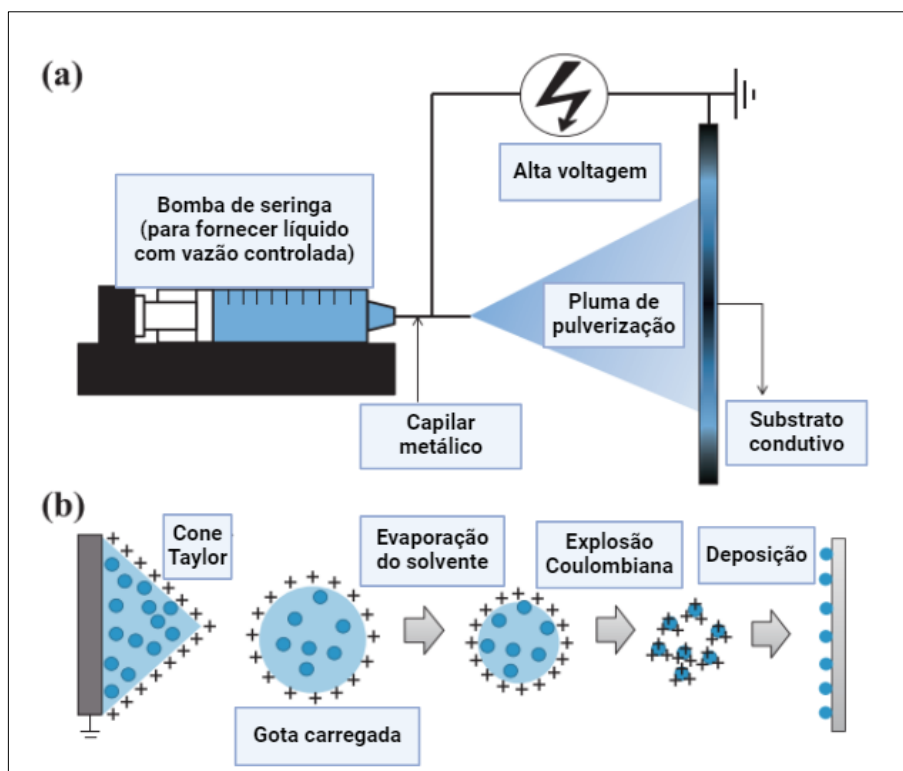


Figura 10 – Fonte de ionização por *electrospray*.
 Fonte: Adaptado de Saallah *et al.*, 2018 (113).

Resumidamente, a amostra é conduzida por um capilar em nano-fluxo, sendo nebulizada à medida que a solução com a amostra é submetida ao processo de *electrospray*. Este processo faz uso de uma diferença de potencial de cerca de 2,4 kV entre a extremidade do capilar e a entrada do espectrômetro de massas. Tal diferença de potencial induz a formação de gotículas são carregadas com o analito, na extremidade do capilar, formando um cone conhecido como “cone de Taylor”. As gotículas carregadas, são conduzidas do capilar à entrada do espectrômetro (114). Com a evaporação do solvente, a densidade de cargas nas gotículas aumenta, fazendo com que a tensão superficial não consiga mais manter a gotícula, ocorrendo uma explosão *Coulombiana*, que fragmenta as gotículas em gotas ainda menores, até um ponto onde os peptídeos são “arrancados” de dentro da solução pelo campo elétrico. O analito será posteriormente analisado e separado pelo analisador de massas conforme sua razão m/z (115).

Existem vários tipos de analisadores de massas que podem ser combinados com o

modo ESI. O mais comum, devido à sua facilidade de uso e custo mais baixo, é o analisador quadrupolar. O ESI com filtro quadrupolar é amplamente empregado em estudos sobre o comportamento dos íons na fase gasosa, especiação de complexos metálicos e investigações dos processos fundamentais de ionização. Outros tipos de analisadores de massas, como TOF, setor magnético, quadrupolo de armadilha linear (LTQ – do inglês, *linear trap quadrupole*) e ressonância ciclotrônica, também estão disponíveis comercialmente (105).

1.5.4 ANALISADORES DE MASSAS QUADRUPOLO, LTQ E ORBITRAP

Analisadores de massas são frequentemente combinados em espectrômetros híbridos de alta resolução, como o Orbitrap Fusion Lumos (utilizado nesse trabalho), permitindo uma análise mais abrangente e detalhada das amostras (Figura 11).

O quadrupolo é um tipo de analisador de massas que utiliza campos elétricos e magnéticos para selecionar íons com base em sua razão m/z . Os quadrupolos são comumente usados como filtros de seleção de massas para isolar íons de interesse antes de serem analisados por outros analisadores, como os LTQ e Orbitrap. Eles são altamente versáteis e podem ser utilizados em uma variedade de modos, incluindo varredura de massas, varredura de íons e varredura de precursor (116).

O LTQ é um analisador de íons que utiliza uma armadilha iônica linear para capturar e manipular os íons. Ele pode realizar uma variedade de operações, incluindo a fragmentação de íons por colisão com gás, denominada dissociação induzida por colisão (CID – do inglês, *collision-induced dissociation*), bem como a análise de íons por espectrometria de massas de ionização por *electrospray* (ESI-MS) e por laser assistida por matriz (MALDI-MS). O LTQ é conhecido por sua sensibilidade e capacidade de fragmentação (117).

O Orbitrap é um analisador de massas de alta resolução que se baseia na detecção da corrente induzida por íons que orbitam ao redor de uma haste central. Os íons geram uma

corrente que é medida para determinar as massas com alta precisão e resolução. O Orbitrap é especialmente útil para análises de proteínas, metabolômica e estudos de pequenas moléculas, devido à sua alta resolução e capacidade de determinar massas com precisão (118).

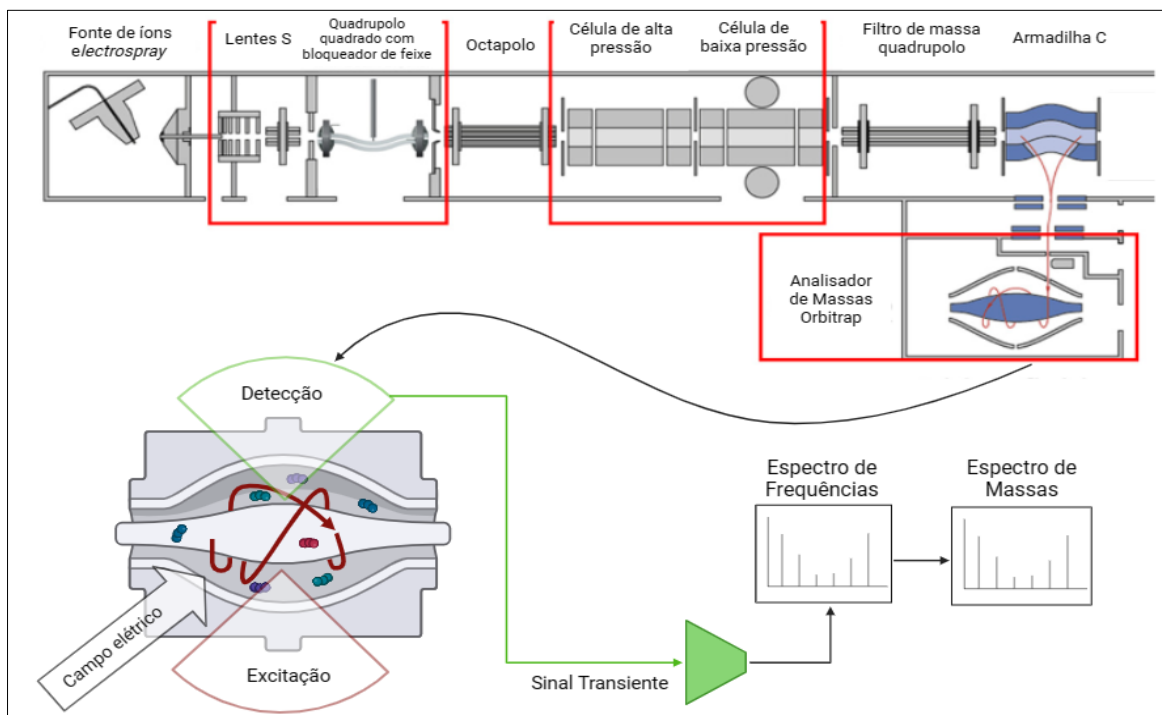


Figura 11 – Esquema geral dos analisadores do espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos.
Fonte: Adaptado de Michalski *et. al.*, 2012 (116).

2 JUSTIFICATIVA

Diagnósticos rápidos e precisos para a detecção de bactérias resistentes tornam-se cada vez mais cruciais na área da saúde. Além disso, o emprego de tecnologias como PCR em tempo real, sequenciamento de próxima geração (NGS) e inteligência artificial e aprendizado de máquina, podem resultar em economia de recursos, reduzindo o tempo nas unidades de tratamento intensivo (UTIs) e otimizando a aplicação de múltiplos antibióticos, frequentemente caros e de amplo espectro. (119). Isso não apenas beneficia os pacientes, ao permitir tratamentos direcionados, mas também contribui para a gestão financeira sustentável das instituições de saúde.

Atualmente, as técnicas de sequenciamento genético têm sido amplamente adotadas para identificação de bactérias para fins diagnósticos. Por outro lado, as tecnologias de MS têm se tornado cada vez mais eficientes. O uso dessas tecnologias representa um avanço significativo no diagnóstico microbiológico e contribui para uma abordagem mais rápida e eficaz no tratamento de infecções.

A identificação de padrões na expressão de proteínas melhora a compreensão de fenômenos biológicos. A proteômica, uma ciência multidisciplinar, caracteriza sistemas biológicos pelo perfil de proteínas ao longo do tempo e espaço. Suas metodologias possibilitam a identificação e quantificação em larga escala, com grande potencial para analisar processos biológicos.

Diante do exposto, reconheceu-se a necessidade de conduzir uma pesquisa visando aprimorar tecnologias complementares para diagnosticar perfis de resistência às polimixinas em *Acinetobacter baumannii*, conforme proposto neste trabalho.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia experimental e computacional baseada em proteômica para distinguir cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes e susceptíveis à polimixina B.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Gerar bibliotecas espectrais de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes à polimixina B.

3.1.2 Gerar bibliotecas espectrais de cepas de *Acinetobacter baumannii* susceptíveis à polimixina B.

3.1.3 Classificar os microrganismos com base no perfil de espectro de massas.

3.1.3 Realizar a análise computacional dos dados espectrais das cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes e susceptíveis à polimixina B, utilizando inteligência artificial para identificar padrões e otimizar a interpretação dos resultados.

4 MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este foi um estudo “*in vitro*” utilizando isolados bacterianos de *Acinetobacter baumannii* resistentes e susceptíveis às polimixinas (B e colistina), provenientes do banco de cepas do Laboratório Central do estado do Paraná - LACEN-PR. Assim, a submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos não se fez necessária.

Conforme definido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, a apresentação da metodologia, resultados e discussão podem ser feitos no formato de artigo científico, alternativa adotada neste estudo.

O item 4.1 complementa os materiais utilizados no estudo. O artigo apresentado no item 4.2 foi publicado pela revista *Journal of Proteomics*, fator de impacto 3.855.

4.1 CRITÉRIOS DE ESCOLHA DAS CEPAS

As cepas foram selecionadas entre 2018 a 2022, com o interesse em cepas dos períodos pré-pandêmico e pandêmico, produtoras ou não dos genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{NDM}*, responsáveis pela resistência a carbapenêmicos em *Acinetobacter baumannii*. Devido à resistência à polimixina ser rara, as cepas resistentes foram escolhidas por ordem de chegada nos respectivos anos, e pareadamente foram escolhidas as cepas susceptíveis, de acordo com a região geográfica. A origem, sexo, idade dos pacientes e concentração inibitória mínima da polimixina B estão no quadro 1.

<i>A. baumannii</i> susceptível à polimixina B	Cidade de origem	Sexo	Idade	CIM polimixina B
Amostra 1	Cascavel-PR	Masculino	33 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 2	Curitiba-PR	Feminino	38 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 3	Curitiba-PR	Feminino	54 anos	1 µg/mL
Amostra 4	Curitiba-PR	Masculino	70 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 5	Londrina-PR	Feminino	67 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 6	Chapecó-SC	Masculino	83 anos	1 µg/mL
Amostra 7	Joinville-SC	Masculino	40 anos	2 ug/mL
Amostra 8	Tubarão-SC	Masculino	77 anos	1 µg/mL
Amostra 9	Porto-Alegre-RS	Feminino	69 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 10	Porto-Alegre-RS	Masculino	42 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 11	Cuiabá-MT	Feminino	58 anos	1 µg/mL
Amostra 12	Cuiabá-MT	Masculino	85 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 13	Campo Grande-MS	Masculino	35 anos	<= 0,5 ug/mL
Amostra 14	Campo Grande-MS	Masculino	67 anos	1 µg/mL
<i>A. baumannii</i> resistente à polimixina B	Cidade de origem	Sexo	Idade	
Amostra 1	Curitiba-PR	Feminino	29 anos	>=32 µg/mL
Amostra 2	Curitiba-PR	Masculino	52 anos	64µg/mL
Amostra 3	Curitiba-PR	Feminino	31 anos	4 µg/mL
Amostra 4	Foz do Iguaçu-PR	Masculino	39 anos	4 µg/mL
Amostra 5	Londrina-PR	Masculino	67 anos	>=32 µg/mL
Amostra 6	Chapecó-SC	Masculino	71 anos	>=32 µg/mL
Amostra 7	Itajaí-SC	Feminino	21 anos	>=32 µg/mL
Amostra 8	Joinville-SC	Masculino	41 anos	64µg/mL
Amostra 9	Porto-Alegre-RS	Masculino	74 anos	4 µg/mL
Amostra 10	Porto-Alegre-RS	Feminino	77 anos	>=32 µg/mL
Amostra 11	Cuiabá-MT	Masculino	45 anos	>=32 µg/mL
Amostra 12	Cuiabá-MT	Feminino	34 anos	4 µg/mL
Amostra 13	Campo Grande-MS	Masculino	43 anos	>=32 µg/mL
Amostra 14	Dourados-MS	Masculino	55 anos	>=32 µg/mL

Tabela 1 - Origem e dados das cepas estudadas.

Fonte: O autor, 2024.

4.2 ARTIGO PUBLICADO

TITLE:

Beyond the Identifiable Proteome: Delving into the Proteomics of Polymyxin-Resistant and Non-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazilian Hospitals

AUTHORS:

Amanda Dal Lin^{1,2&}, Juliana de S. da G. Fischer^{1&}, Marlon D. M. Santos^{1,3}, Amanda Caroline Camillo-Andrade^{1,3}, Louise Ulrich Kurt¹, Tatiana A. C. B. Souza¹, Ana Beatriz Lyrio Lajas¹, Bernardina Rivera³, Magdalena Portela³, Rosario Duran³, Marcelo Távora Mira², Marcelo Pilonetto^{*2,4}, Paulo Costa Carvalho^{*1}

1. Laboratory for structural and computational proteomics, Carlos Chagas Institute, Fiocruz – Paraná, Brasil.
2. Laboratório Experimental Multiuso. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil.
3. Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo/IIBCE, Montevideo, Uruguay.
4. Laboratório Central do Estado do Paraná, Brasil.

& Equal contributions

*Corresponding authors:

Address: Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: m.pilonetto@pucpr.br

Address: R. Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, PR, Brasil. E-mail: paulo@pcarvalho.com

ABSTRACT

This work discloses a unique, comprehensive proteomic dataset of *Acinetobacter baumannii* strains, both resistant and non-resistant to polymyxin B, sourced from Brazil. Generated using Orbitrap Fusion Lumos, the data offers a granular view of the proteomic profiles intricately linked to polymyxin B resistance or susceptibility. From nearly 4 million tandem mass spectra, the software DiagnoMass produced 240,685 quality-filtered mass spectral clusters, of which PatternLab for proteomics identified 44,553 peptides mapping to 3,479 proteins. Crucially, DiagnoMass shortlisted 3,550 and 1,408 unique mass spectral clusters for the resistant and non-resistant strains, respectively, with only about a third with sequences (and PTMs) identified by PatternLab. Further open-search attempts via FragPipe yielded an additional ~20% identifications, suggesting the remaining unidentified spectra

likely arise from complex combinations of post-translational modifications and amino-acid substitutions. This highlights the untapped potential of the dataset for future discoveries, particularly given the importance of PTMs, which remain elusive to nucleotide sequencing approaches but are crucial for understanding biological mechanisms. Our analysis reveals adaptations in the resistant strain, including enhanced detoxification, altered protein synthesis, and metabolic adjustments.

INTRODUCTION:

Acinetobacter baumannii is a gram-negative coccobacillary bacterium, increasingly recognized as a significant public health concern. *A. baumannii* is commonly found in hospital environments and can cause various infections, including hospital-acquired pneumonia (HAP), ventilator-associated pneumonia (VAP), and bacteremia (120). The emergence and spread of antibiotic resistance in *A. baumannii* are a complex phenomenon influenced by genetic and environmental factors. This microorganism is notorious for its ability to rapidly develop resistance to antibiotics, making it a challenging pathogen to treat (15).

Addressing bacterial resistance to antibiotics is crucial; therefore, continued research into new antibiotics, efficient vaccines, alternative treatments, faster and more sensitive diagnoses, and promoting the appropriate use of antibiotics (Antimicrobial Stewardship) to delay the development of resistance are essential (121). Among the various types of antibiotics, Carbapenem was once considered the last therapeutic option for treating multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR) infections. However, in recent years, isolates resistant to this class have emerged, leading to the clinical application of polymyxins. With the emergence of extensively drug-resistant and even PDRs, clinicians have even been forced to use polymyxin B and E (colistin), an antibiotic group that can do kidney and nerve damage, to combat these infections (122). As an aggravator, the COVID-19 pandemic has led to an increase in infections by multidrug-resistant bacteria, further impacting the global scenario. Unfortunately, during the pandemic, the uncontrolled use of antimicrobials has accelerated the decrease of efficiency of these antibiotic classes as well (123).

In 2019, Murray's published data estimated deaths associated with bacterial antimicrobial resistance (AMR) reaching 4.95 million, a figure seven times higher than the reports described by the Centers for Disease Control and Prevention in 2013 and O'Neill in 2016 (8,124). Particularly alarming is the situation in the southern region of Brazil, where recent

research revealed an extensive presence of drug-resistant *A. baumannii*; from 2017 to 2020, 659 isolates were analyzed (125). Polymyxin B (PMB) remained the only antimicrobial with in vitro efficacy. In another report, an outbreak of carbapenem-resistant strains in an intensive care unit was detailed (126); thus, deepening our concerns. With escalating resistance, the necessity for stringent surveillance and conscientious antimicrobial stewardship becomes even more pressing.

Brazil, with its extensive population, diverse healthcare infrastructure, including the Unified Health System (SUS), and its network of Central Public Health Laboratories (LACENs), provides a unique setting for exploring the emergence and spread of antibiotic resistance in *A. baumannii*. This intricate assembly of public health services and diagnostic laboratories nationwide offers a comprehensive and nuanced perspective on the country's ongoing efforts to combat antibiotic resistance. With this as motivation, our data descriptor originates from the joint efforts of these systems and aims to contribute to a broader understanding of the molecular underpinnings of resistance and the drivers behind the emergence of multidrug-resistant strains within the country. Here, we provide and explore proteomic profiles of *A. baumannii* strains originating from the states of Paraná and Santa Catarina. It is important to note the escalating prevalence of polymyxin-resistant *A. baumannii* strains in Brazil, especially in this region. This trend urges a deeper understanding of these strains and underscores the need for novel therapeutic options. Such knowledge is crucial in devising innovative therapeutic strategies, surveillance control, and preserving the efficacy of our current antibiotic arsenal and thus should serve as an example for similar investigations worldwide (127).

Proteomics is a powerful tool for understanding local antibiotic-resistant bacteria, providing a comprehensive view of their proteome (128). This information can identify specific proteins involved in antibiotic resistance and understand cellular changes in response to antibiotic exposure. Proteomics can also serve as a diagnostic tool to detect resistance-related proteins, such as beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes (129). However, the presence of these enzymes doesn't definitively indicate active resistance, which could be latent or suppressed under certain conditions (130). Moreover, resistance could be conferred by a combination of post-translational modifications and amino acid substitutions, which are frequently missed by proteomic search engines, and undetectable by DNA sequencing approaches (131). Current solutions, such as Bruker's MALDI Biotyper, exemplify the utility of mass spectrometry in bacterial diagnostics. However, these systems typically rely on single spectra, which limits their discriminative power for diagnosing resistant bacteria.

In contrast, shotgun proteomics profiles provide a more expansive and detailed analysis of protein fragments, enhancing the discriminatory power when identifying and classifying bacterial strains. In this vein, the studies by Ping Wang et al. and Zhenbo Xu et al. provide comprehensive proteomic analyses of *Acinetobacter baumannii*, revealing significant differences between drug-resistant and drug-susceptible isolates, and identifying differentially expressed proteins that may influence drug resistance, particularly those located in the periplasmic or outer membrane of the cell (132,133).

This data descriptor presents proteomic profiles of polymyxin-resistant *A. baumannii* strains from Brazilian hospitals, highlighting regional variations. By cross-examining proteomic data across diverse strains and resistance profiles, our dataset uncovers unique evolutionary trends and adaptations under antibiotic pressure. These insights inform Antimicrobial Stewardship in Brazilian healthcare settings and can be instrumental in developing diagnostic tools and slowing the development of further resistance.

We utilized DiagnoMass (134) to investigate the proteomic data, grouping similar spectra into spectral clusters and pinpointing those unique or significantly different between biological conditions. DiagnoMass interfaced with PatternLab for proteomics V for peptide spectrum matching (87) and FragPipe for open search (135), shortlisting spectral clusters unique to a biological condition. Notably, we aim to discover and highlight those unique mass spectral clusters that remain unidentified by both search engines. This methodology offers an unbiased perspective for comparing biological conditions and promises to shed light on potential biomarkers key in understanding and combating drug resistance in *A. baumannii*. As such, we argue that this is pivotal for surveillance purposes and can serve as a resource for the development and refinement of diagnostic tools. Such data can form the foundational blocks for integration with machine learning algorithms, predicting antibiotic resistance based on comprehensive proteomic profiles.

METHODOLOGY:

Sample acquisition and preparation:

We were granted permit A64AE41 from the Brazilian National System of Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge (SisGen), which authorized us to assess samples of *A. baumannii*. The bacterial strains (14 resistant and 14 non-resistant to polymyxin B) were obtained from the "*Laboratório Central do Estado do Paraná*". Stored at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) medium, the strains were thawed and streaked onto

MacConkey agar medium using a 10 μ L bacteriological loop. Following incubation for 24 hours at 36 °C, growth and isolate purity were assessed. Bacterial lysis was carried out following the SPEED protocol (136). Subsequently, sample quantification was performed using the fluorometric Qubit assay, as per the manufacturer's instructions. One hundred micrograms of each sample were reduced with dithiothreitol (final concentration 10 mM) for 30 minutes at 60°C, cooled to room temperature (20 °C) followed by alkylation with iodoacetamide (final concentration 30 mM) for 25 minutes. Finally, the samples were digested overnight with trypsin in a 1/50 (E/S) ratio at 37 °C. The reaction was interrupted with trifluoroacetic acid (TFA) 10% (final concentration of 1%), followed by centrifugation for 15 minutes at 18,000 x g and again quantified by the fluorometric Qubit assay. Ten micrograms of each sample were desalted with Stop and Go Extraction Tips (Stage Tips) as described by Rappisber and collaborators (137).

Mass Spectrometry Acquisition:

The peptides were subjected to LC-MS/MS (Liquid chromatography with tandem mass spectrometry) analysis with an UltiMate 3000 (Thermo Fisher®) ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system coupled with an Orbitrap Fusion™ Lumos™ mass spectrometer (Thermo, San José), as follows. The peptide mixtures were loaded into a column (75 mm i.d., 30 cm long) packed in-house with a 3 μ m ReproSil-Pur C18-AQ resin (Dr. Maisch) with a flow of 250 nL/min and subsequently eluted with a flow of 250 nL/min from 5% to 40% ACN in 0.1 % formic acid in a 140 min gradient (138). The mass spectrometer was set in data-dependent acquisition (DDA) mode to automatically switch between full-scan (MS) and MS/MS (MS2) acquisition. Survey MS spectra (from m/z 300 – 1,500) were acquired in the Orbitrap analyzer with a resolution of 120,000 at m/z 200. The most intense ions captured in 2s cycle time were chosen, excluding unassigned ones that had a 1+ charge state. The ions were sequentially isolated and fragmented using higher-energy collisional dissociation (HCD) with normalized energy of 30. The fragment ions were analyzed with a resolution of 15,000 at 200 m/z . The general mass spectrometric conditions were spray voltage, 2.5 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature of 250°C; predictive automatic gain control (AGC) enable, and S-lens RF level of 40% Mass spectrometer scan functions and nLC solvent gradients were regulated using the XCalibur 4.1 data system (Thermo, San José). Two technical replicates were acquired for each biological replicate.

Data Analysis:

Dataset Quality Control with RawVegetable 2.0

To ensure the quality control of our mass spectrometry data, especially between the technical replicates of the experiments, we utilized RawVegetable, a specialized software tool tailored for mass spectrometry data assessment (139). This tool provided us with several key modules. The charge state chromatogram module, as well as the TopN density estimation module, enabled us to optimize chromatography. The TopN is particularly interesting, as it enables the control of how many MS/MS scans are being generated by cycle, which in turn helped us identify retention time intervals of under or over-sampling, facilitating necessary gradient adjustments. The chromatography reproducibility module allowed for pairwise comparisons between multiple experiments, ensuring the consistency and reliability of our data. And lastly, we were able to assess the quality of MS/MS spectra by looking at their Xrea scores throughout the run and the precursor signal ratio distribution to analyze the fragmentation efficiency.

Protein and peptide identification with PatternLab for Proteomics V

We utilized PatternLab for Proteomics V (version 5.0.0.152) for peptide spectrum matching due to its proven reliability and accessibility (140). the software is freely available at <http://patternlabforproteomics.org>. Data analysis followed the software's protocol (87), with the exception of the new search feature that enables multiplexed spectra identification through the Y.A.D.A. 3.0 deconvolution algorithm (140,141).

A. baumannii sequences (5,909 in total) were sourced from UniProt in March 2023, supplemented with 127 common mass spectrometry contaminants and searched using PLV's embedded Comet (142). The search included semi-tryptic and fully-tryptic peptide candidates, allowing up to 2 missed cleavage sites. Variable modifications included oxidation of methionine and deamidation of asparagine and glutamine, while carbamidomethylation of cysteine was considered a fixed modification.

Validation of peptide-spectrum matches (PSMs) was conducted using the Search Engine Processor (SEPro) integrated into PLV (143). This aimed to generate a list of identifications with less than 1% false discovery rate (FDR) at the protein level. Identifications were grouped by charge state (2+ and $\geq 3+$) and tryptic status, forming four distinct subgroups. Each group was sorted based on a Bayesian discriminator generated from XCorr, DeltaCN,

DeltaPPM, and Peaks Matched values. A cutoff score was set to accept a 2% FDR at the peptide level, based on the number of labeled decoys. This process was independently performed on each data subset, resulting in an FDR independent of charge state or tryptic status. Additional requirements included a minimum sequence length of six amino-acid residues and PSMs with less than 10 ppm from the global identification average. One-peptide identifications (proteins identified with only one mass spectrum) with an XCorr of less than 2 were discarded, leading to FDRs at the protein level of less than 1% for all search results.

Differential proteomics

We utilized the "Peptide-Centric Differential Proteomic Analyzer" module, integrated within the XIC Explorer from PLV, to identify differentially abundant proteins. This module initiates the process by normalizing peptide quantification values according to the respective Total XIC for each run. For our analysis, we only considered peptides that were found in at least eight biological replicates (more than half) of both condition and exhibited a minimum absolute 2.3-fold change ($\text{Log}_2(1.2)$). Subsequently, a single-sample *t*-test was applied to the fold changes of peptides within each protein. By treating each peptide as an independent observation, we minimized error propagation, thereby enhancing the reliability of our analysis. Proteins with less than 3 peptides were not considered. The method also incorporates the principle of maximum parsimony for protein inference. To control the false discovery rate at the protein level, we employed the Benjamini-Hochberg procedure with a *q*-value threshold of 0.05. This rigorous approach ensures the reliable identification of differentially abundant proteins.

For proteins uniquely identified to a single condition, we only considered those present in at least five biological replicates.

Leveraging DiagnoMass for Exploratory and Condition-Specific Spectral Clustering

Shotgun proteomic data was processed using DiagnoMass, a tool for spectral clustering. Parameters were set to optimize results: *BinOffset* at 112.456, *BinSize* at 1.0005, and *BinMaxMZ* at 1612.2055 defined the binning strategy. A *SimilarityThreshold* of 0.75 ensured high similarity within clusters. Only tandem mass spectra decurrent from precursors with charge states from 2 to 5 and having 10 and more peaks above 500 *m/z* were considered. *PrecursorTolerance* was set at 0.002 *m/z* to accommodate minor variations in precursor *m/z*.

values. RetentionTimeTolerance was set at 10 minutes, accounting for variability in liquid chromatography separation times. These parameters culminated in spectral clusters, which were then annotated using PatternLab V. Only spectral clusters belonging to five or more biological replicates of a given biological condition and not identified in any other biological replicate from the other condition were shortlisted for further evaluation using open-search.

Annotating Discriminative and Unidentified Spectral Clusters Through Open-Search

Open-search is a versatile method that allows for the identification of unexpected post-translational modifications and sequence variants. For this purpose, we employed FragPipe, a comprehensive tool for large-scale proteomic data analysis (135). We adhered to its default parameters for open-search, using the same FASTA sequence database as previously mentioned. This approach aimed to maximize the identification and annotation of unidentified spectral clusters, thereby enhancing our understanding of the proteomic landscape under investigation.

RESULTS:

Mass Spectral Quality Control

Initial comparisons of the full chromatograms between the technical replicates, as exemplified by Figure 12, show not only the great similarity between the runs, but also very well-defined peaks, which indicates good reproducibility between the samples and great separation of the molecules. A full quality control analysis done in RawVegetable (139) also presents charged chromatograms, which indicate when most of the species of each individual charge eluted. In these samples, the charged chromatograms showed an abundance of 2+ and 3+ species throughout the whole chromatography, as expected of linear peptides, which also indicates a successful digestion of the samples.

The TopN density estimation of this data presented a satisfactory spectra acquisition throughout the experiment, with an average of 30 to 35 MS/MS scans per MS spectrum for most of the chromatography run, which translates in a great amount of spectra generated for the peptide identification step.

In terms of the quality of the MS/MS spectra generated, the distribution of Xrea scores showed that most MS/MS spectra had a good overall quality and indicated that the higher quality of spectrum was generated by the first 70 minutes of the run. The distribution of precursor signal ratio in the MS/MS scans shows that, in all samples, most of the scans had

less than 2.5% of precursor signal left, which indicates a satisfactory fragmentation of the peptides, thus possibly generating better signal for the fragments and a better spectrum for the identification step.

All of these analyses demonstrate that the samples had very efficient LC-MS runs, and no major issues were detected, which makes the data ready for further steps in the study. A full summary of the quality control analysis, complete with images for each pair of replicates can be found in the supplementary material (https://docs.google.com/document/d/1No1wA_k7W7-sXryXMJcc0ixLcxJ-2s0t/edit?usp=drive_link&oid=112942517307199185302&rtpof=true&sd=true).

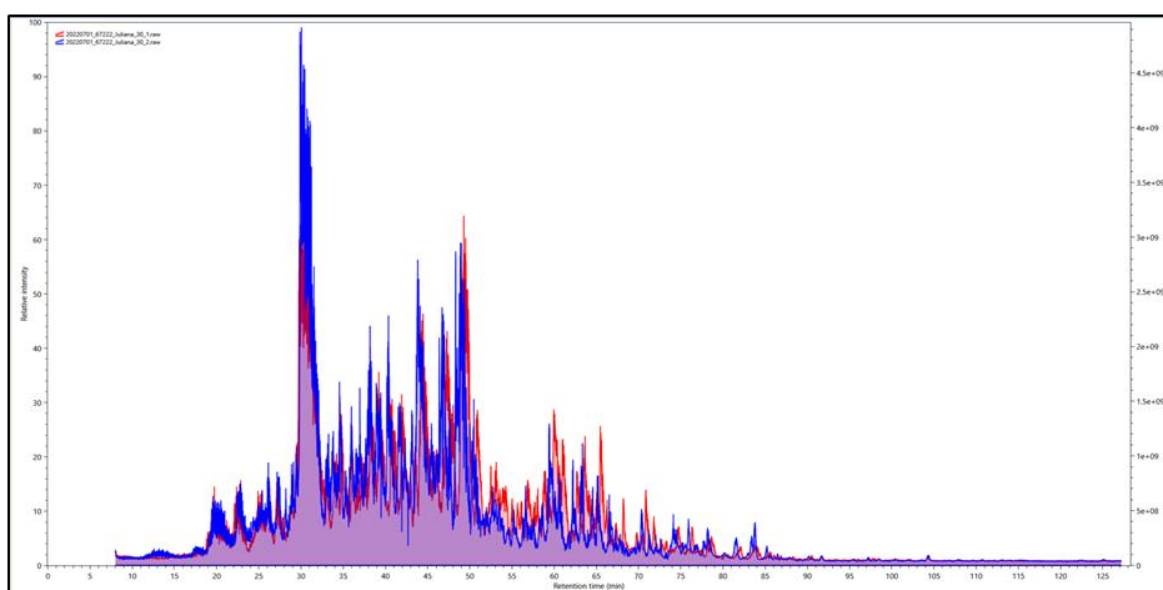


Figure 12 – Ion chromatogram comparison of technical replicates of *Acinetobacter baumannii* resistant to polymyxin B.

Protein Identification and Differential Abundance Analysis Using PatternLab for Proteomics

Our analysis with PatternLab for Proteomics V yielded 928,831 identified tandem mass spectra, which corresponded to 44,553 peptides mapping to 3,479 proteins across all analyses. The comprehensive list of proteins and peptides is available at 'All Proteins' and 'All Peptides' tabs of the Supplementary Spreadsheet, respectively - https://docs.google.com/spreadsheets/d/1n7G7ZnF84K2VAzNKOQclK2DN4BHc6UIU/edit?usp=drive_link&oid=112942517307199185302&rtpof=true&sd=true. We identified 151 proteins that were exclusively identified in the resistant strains, considering only those found in five or more biological replicates specific to that condition (see 'Unique Resistant'

tab). Conversely, a single protein (A0A0D5YDM4, Signal peptide) was exclusively identified in the non-resistant condition. We shortlisted 241 proteins identified in both conditions but exhibiting increased abundance in the resistant strains ('Up Resistant' tab), and 3 with increased abundance in the non-resistant strains ('Up Non-Resistant' tab).

Discriminant Clusters via DiagnoMass

DiagnoMass was employed to cluster spectra based on precursor's charge state, m/z , and spectral angle. Not all spectra were assigned to clusters; for instance, only spectra with 10 or more m/z peaks above 500 were considered, and clusters had to contain at least two mass spectra. Our full dataset comprised 3,884,700 tandem mass spectra generated from both resistant and non-resistant strains. Of these, DiagnoMass considered 1,535,653 for generating the clusters, resulting in a total of 240,685 spectral clusters. Given that PatternLab identified a total of 44,553 peptides across all experiments, which could theoretically translate to around 89,106 spectral clusters (assuming that typically the same peptide is observed with 2 charge states), it's evident that the identified peptides explain only a little more than a third of the spectral clusters. This leaves a significant amount of information unexplored.

We propose that the most relevant information, not only in our work but also in other proteomic studies addressing conditions like cancer, might not be present in public databases. Alternatively, it might be tied up in post-translational modifications (PTMs) that are often missed by search engines due to their complexity or a combination of PTMs. These overlooked PTMs could play crucial roles in biological phenomena, such as enhancing bacterial resistance mechanisms as very well depicted in the work from Abouelhadid et. al. (144).

Our dataset supports this hypothesis. For instance, the PCAs generated by PatternLab and DiagnoMass show a clear difference (Figure 13). While PatternLab only considers information from identified peptides, DiagnoMass bases its analysis on spectral clusters. This difference in approach allows DiagnoMass to reveal information that is typically missed by conventional proteomics workflows, thereby providing a more comprehensive understanding of the biology at hand. Importantly, both PatternLab and DiagnoMass were developed by our group, utilizing the same underlying libraries. This ensures consistency in the analytical approach and gives us confidence in the reliability and validity of the DiagnoMass approach.

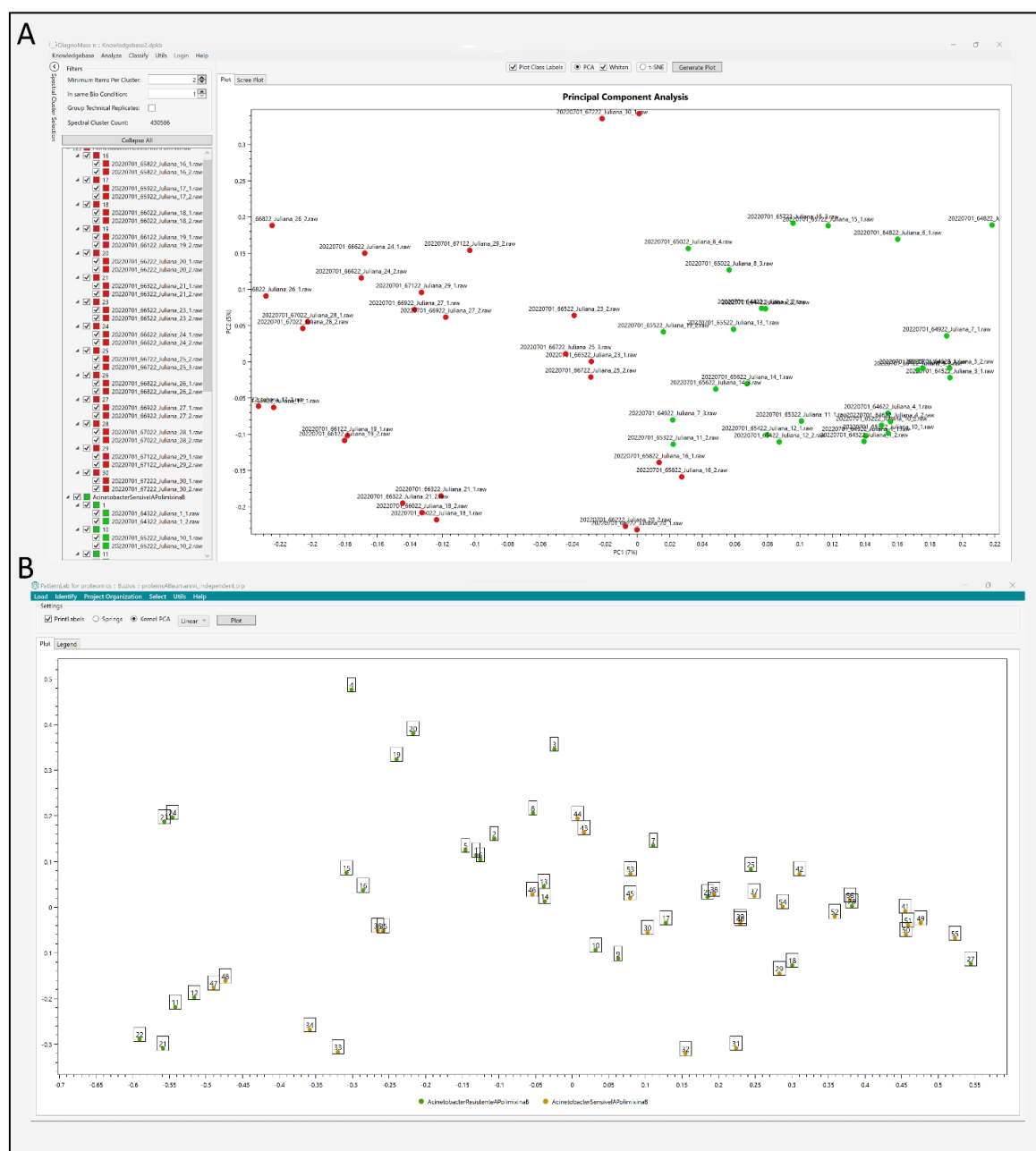


Figure 13 – DiagonMass vs PatternLab PCA plots of polymyxin B resistant *A. baumannii* - This figure presents a side-by-side comparison of *A. baumannii* strains resistant and non-resistant to polymyxin B, as visualized through DiagonMass and PatternLab. The upper panel displays a DiagonMass-generated PCA scatterplot, with spectral clusters from peptides (identified or not) depicted as red (resistant) and green (non-resistant) dots, indicating a clear proteomic distinction between the strains. Conversely, the lower panel shows a PatternLab-generated plot, based solely on identified peptides, where the resistant and non-resistant strains are represented by green and light-brown dots, respectively, with no evident separation.

Utilizing DiagonMass, we generated a heatmap and histogram, focusing on clusters derived

from spectra found in at least five instances of the same biological condition (Figure 14). This analysis suggests a correlation within the proteomic profiles of the resistant and non-resistant strains. As indicated in Figure 14, DiagnoMass shortlisted 3,550 and 1,408 clusters exclusive to the resistant and non-resistant strains, respectively. Out of these, PatternLab could confidently identify spectra from only 1,281 and 193 clusters, respectively. A detailed manual review indicates the presence of numerous high-quality, yet unidentified, mass spectra. For instance, we present an example of a consensus mass spectrum from cluster 12,192, which remained unidentified (Figure 15). Motivated by these findings, we exported all unidentified spectra from the unique clusters for further analysis using FragPipe, an open-search tool designed to search for variants not found in our sequence database. The exported mass spectra are provided in [Supplementary2-UnidentifiedResistant \(1\).mgf](#) and [Supplementary3-UnidentifiedNonResistant.mgf](#).

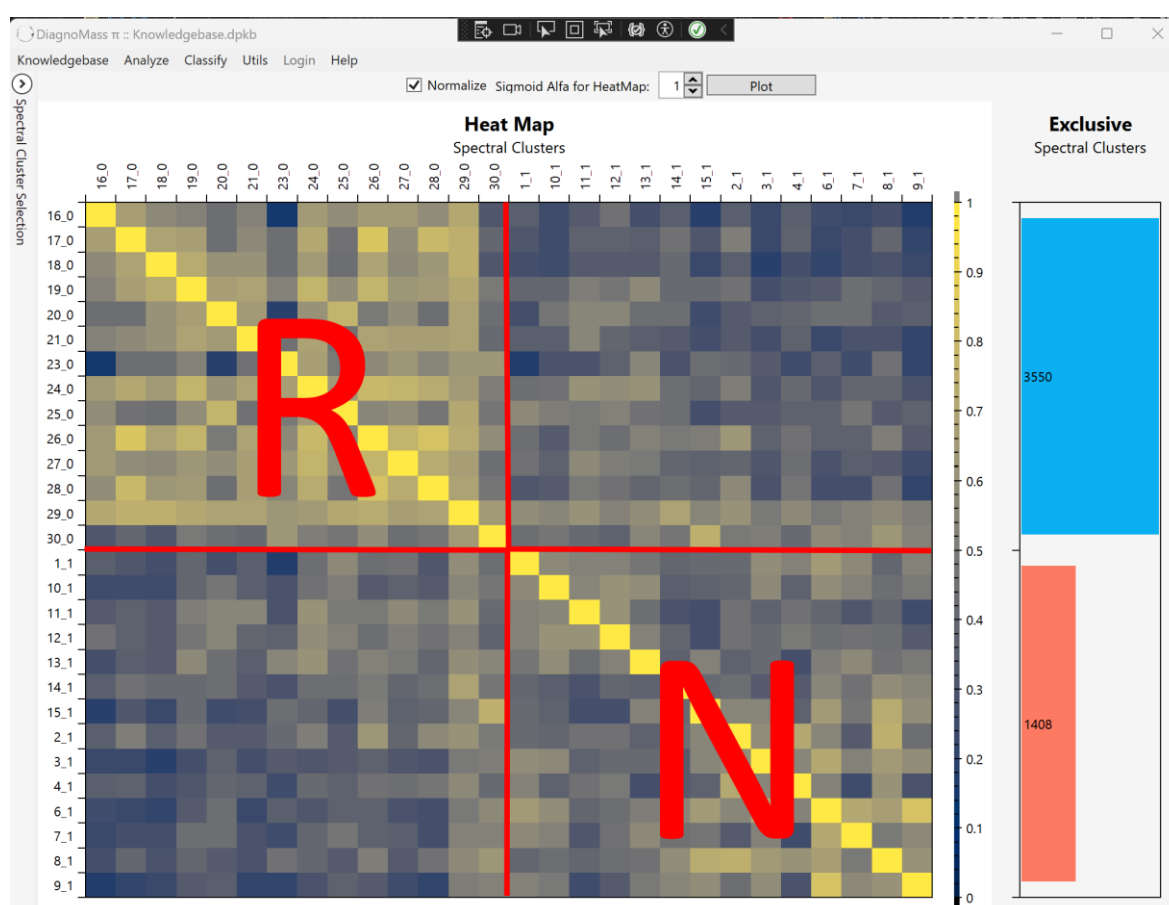


Figure 14 – Heatmap and Histogram of Spectral Clusters - This figure presents a heatmap of all bacterial samples analyzed in the study, generated using DiagnoMass. The heatmap visualizes the similarity in proteomic profiles between each pair of samples, with colour intensity indicating the degree of similarity. On the right, two bars represent the number of spectral clusters unique to each condition, i.e., the resistant (blue) and non-resistant (red) bacteria. The figure illustrates the significant differences in the proteomic

profiles, especially the greater abundance in unique spectral clusters in the resistant condition, highlighting the presence of numerous discriminative and yet unidentified mass spectral clusters. The results underscore the potential of this overlooked data in understanding antibiotic resistance. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

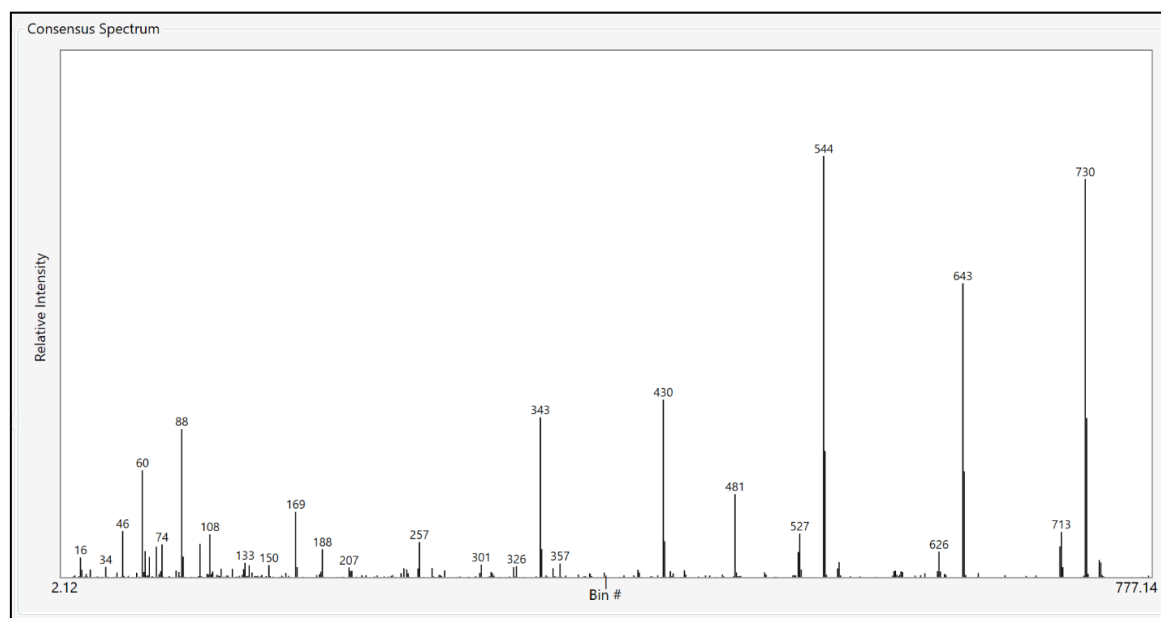


Figure 15 – Consensus Spectrum Illustration - The figure above presents a consensus spectrum, as provided by DiagnoMass, generated through the averaging of intensity values for all mass spectral peaks within a specific spectral cluster. The y-axis denotes relative intensity, while the x-axis represents the corresponding mass spectral bin number. This consensus spectrum provides a comprehensive representation of the spectral cluster's characteristic features.

Unveiling Hidden Proteomic Profiles: The Power of Open-Search

Employing FragPipe's open-search capabilities, we identified 1,004 peptides originating from the 3,550 clusters exclusive to the resistant strains. These results underscore the value of integrating complementary search strategies alongside the prevalent peptide spectrum matching approach in proteomic identification. However, they also highlight the potential for further refinement in current proteomic identification tools. We speculate that the unidentified mass spectra may predominantly stem from peptides bearing a combination of post-translational modifications (PTMs) and amino acid substitutions. The peptides identified by FragPipe are made available in the 'Open-Search Resistant' tab of the Supplementary Spreadsheet.

Discussion

Proteins exclusively identified or more abundant in the resistant strains.

The intricate network of proteins in polymyxin B-resistant *A. baumannii* presents a multifaceted portrait of the mechanisms underlying antibiotic resistance. Each protein, with its unique identifier, contributes to a narrative of adaptation and resilience in the face of antibiotic stress.

Among the proteins exclusively identified in the resistant strain we spotlight the Aldehyde dehydrogenase family protein (A0A429MLH1). By enhancing the bacterium's detoxification capabilities, it serves as a protective shield against the stress induced by polymyxin B. This shield is further fortified by the Glutamate-cysteine ligase (A0A3R9TSX1), which synthesizes glutathione, a molecule crucial for maintaining cellular redox balance and detoxifying reactive oxygen species. Together, these proteins form the bacterium's first line of defense against the antibiotic.

Simultaneously, the bacterium is also adjusting its protein synthesis, as suggested by the presence of the 16S rRNA (Cytosine(1402)-N (4))-methyltransferase (A0A3R9RYT7). This alteration in protein synthesis could be a response to the changes in the bacterium's metabolic and transport processes, indicated by the presence of the D-lactate dehydrogenase (A0A429MKP4) and the ATP-binding cassette domain-containing protein (A0A3R9TP97). By adjusting these processes, the bacterium is likely optimizing its resources to withstand the effects of polymyxin B.

Further supporting this optimization are the Bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase (A0A429MRU0) and the Malate dehydrogenase (quinone) (A0A429MNJ3). These enzymes could be indicative of metabolic adjustments in the resistant strain, fine-tuning its energy production to cope with the antibiotic stress.

These mechanisms, notwithstanding, is further supported by several other proteins in our results that were shortlisted as having increased statistical abundance in the resistance strain and are also henceforth discussed. The ATP synthase gamma chain (V5VHZ7) and ATP synthase subunit b (V5VHG5) are integral components of the cell's energy production machinery. As part of the ATP synthase complex, these molecular motors drive the synthesis of ATP, the primary energy currency of the cell. Their increased abundance in the resistant strain suggests an increased demand for energy, likely to fuel various resistance mechanisms. This is not an isolated phenomenon, but rather a component of a broader response involving numerous other proteins.

For instance, the long-chain fatty acid transporter (A0A3R9RY45) and the RND transporter

(A0A3R9S1X2) exhibit increased abundance in the resistant strain. These proteins facilitate the transport of molecules across the cell membrane. Their increased abundance could be associated with the efflux of polymyxin B from the bacterial cell, suggesting a concerted effort by the bacterium to physically expel the antibiotic from its interior. This strategy likely requires a significant amount of energy, hence the increased abundance of ATP synthase proteins.

In addition to these transporters, several proteins involved in protein synthesis and folding also exhibit increased abundance in the resistant strain. These include various ribosomal proteins such as 50S ribosomal protein L5 (A0A3R9U554), 50S ribosomal protein L4 (V5V9M5), and 30S ribosomal protein S1 (V5VDL1). The ribosome, the cellular machinery responsible for protein synthesis, is likely operating at an increased rate in the resistant strain. This could be a response to the need for more resistance-related proteins, or a general increase in protein synthesis as part of the stress response.

Molecular chaperones like DnaK (A0A3R9S7E3, A0A3R9S0W4) and chaperonin GroEL (V5VAH2) also exhibit increased abundance in the resistant strain. These proteins assist in the folding of newly synthesized proteins and help maintain protein homeostasis under stress conditions. Their up-regulation suggests an increased need for protein quality control mechanisms in the resistant strain, possibly due to the exacerbated rate of protein synthesis. The cell wall and membrane of the bacterium also play a pivotal role in resistance. Several proteins involved in cell wall/membrane biogenesis exhibit increased abundance in the resistant strain, including the cell division protein FtsZ (A0A429MC99) and the lytic transglycosylase (A0A3R9S3W6). Changes in the cell wall/membrane could affect the binding of polymyxin B, thus contributing to resistance.

In addition to these, proteins involved in amino acid synthesis and metabolism, such as tryptophan-tRNA ligase (A0A3R9S100), cysteine synthase (A0A3R9TNT7), and threonine synthase (A0A429MJ25), also exhibit increased abundance in the resistant strain. This could be due to an increased demand for amino acids for protein synthesis, or it could be part of a broader metabolic adjustment in response to antibiotic stress.

The resistant strain also shows an increased abundance of proteins with yet uncharacterized functions, such as the DUF3108 domain-containing protein (A0A3R9UE05, A0A3R9TM67) and the DUF4198 domain-containing protein (A0A0D5YHU6). The roles of these proteins in resistance are not yet clear, but their increased abundance suggests that they might be involved in some way. Further studies are needed to elucidate their functions. In conclusion, the increased abundance of these proteins in polymyxin B-resistant *A.*

baumannii is a testament to the organism's resilience and adaptability. It underscores the intricate interplay of various cellular processes - from energy production and protein synthesis to transport mechanisms, stress response, cell wall/membrane biogenesis, and amino acid metabolism. Each protein, acting not in isolation but in concert with others, contributes to a finely tuned symphony of survival mechanisms. This complex and coordinated response highlights the bacterium's strategic adaptation to antibiotic stress, reminding us of the multifaceted nature of antibiotic resistance. It underscores the need for a holistic approach in the study of antibiotic resistance, one that appreciates the interconnectedness of various proteins and cellular processes. As we continue to unravel this complex web of interactions, we move closer to understanding the full breadth of strategies employed by bacteria in their fight for survival.

Proteins more abundant or exclusively identified in the non-resistant strains.

In the non-resistant strain of *A. baumannii*, several proteins were exclusively identified, suggesting a different set of mechanisms at play compared to the resistant strain. The ExeM/NucH family extracellular endonuclease (A0A3R9S704) might be involved in DNA degradation or repair processes, potentially contributing to the bacterium's ability to maintain genomic integrity under non-stressful conditions.

The Lipoprotein-34 (NlpB) (A0A3R9SE74) and two proteins identified as signal peptides (A0A098SJD0 and A0A0D5YDM4) could be involved in protein localization and transport, ensuring that proteins are correctly delivered to their functional locations within the cell.

Interestingly, several proteins in the non-resistant strain are yet to be characterized (A0A0D5YLE7, A0A429MLR8, and V5VCQ2). Their roles in the non-resistant strain are not yet clear, but their exclusive presence suggests that they might be involved in some way. Further studies are needed to elucidate their functions.

Final Remarks

In conclusion, while Peptide Spectrum Matching (PSM) continues to be the most widely adopted method for proteomic data analysis, providing a robust foundation for the identification of proteins, it is important to recognize the value of complementary approaches such as open-search methods. The latter can uncover additional identifications that might otherwise be overlooked, albeit can be more error-prone. Despite these advancements, a significant portion of mass spectra remains unidentified. These elusive spectra, potentially

carrying a combination of post-translational modifications and amino acid substitutions, may hold the key to understanding specific biological states, including mechanisms of resistance. As we continue to refine and develop our analytical tools, our ability to decode these spectra will undoubtedly enhance our understanding of complex biological systems and their responses to environmental challenges.

Dataset Availability

Data available in Pride. Project accession: PXD043538. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [33] partner repository with the dataset identifier PXD043538.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fiocruz Ideias Inovadoras (VPPIS-004-FIO- 22-2-58), Fundação Araucária (421691/2022-0), CNPq, CAPES, Fondo Sectorial de Salud ANII FSS_X_2022_1_173332.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://DOI: 10.1016/j.jprot.2023.105012>

CONCLUSÕES

- A análise por LC-MS/MS demonstrou ser uma metodologia potencialmente eficaz e acurada para identificação de proteínas, expressas em ambiente de susceptibilidade *versus* resistência à polimixina em *Acinetobacter baumannii*.
- Por meio da análise de abundância diferencial gerada pelo software *PatternLab for Proteomics V*, foi possível identificar um total de 241 proteínas para ambas as condições (cepas de *Acinetobacter baumannii* susceptíveis e resistentes à polimixina). Dentre essas, 151 proteínas foram exclusivas para as cepas resistentes, apresentando maior abundância.
- Foi identificada e classificada uma única proteína (A0A0D5YDM4, peptídeo sinal) exclusiva presente na condição susceptível (não resistente).
- Verificou-se que os resultados obtidos pela ferramenta *DiagnoMass* agruparam e classificaram um conjunto maior de espectros e peptídeos do que os identificados pelo software *PatternLab for Proteomics V*, que utiliza uma base de dados conhecida. Esse fato confirma a existência de informações significativas que ainda estão inexploradas.
- Constatou-se a necessidade de aprimorar as ferramentas de análise proteômica para que possam classificar espectros de massas não identificados, que supostamente estão envolvidos em modificações pós-traducionais (MPTs) e substituições de aminoácidos.

CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA

A importância das tecnologias de espectrometria de massas tem crescido significativamente devido à sua eficiência, robustez e disseminação em diversas áreas. Essas tecnologias desempenham um papel crucial na investigação de genes de resistência antimicrobiana (ARGs) e na identificação de novas espécies. Além disso, destacam-se por serem mais acessíveis em termos de custo, ampliando assim a capacidade de pesquisa e análise em diversos campos científicos. No presente estudo, essa tecnologia contribuiu significativamente para diferenciação individual dos perfis proteômicos de *Acinetobacter baumannii* relacionados à resistência ou suscetibilidade à polimixina B.

A partir da ferramenta de agrupamento espectral *DiagnoMass* foi possível separar as duas cepas estudadas, baseadono-se somente nos espectros de massas, utilizando o software *PatternLab for Proteomics V*, que necessita de bancos de dados proteômicos públicos com proteínas previamente identificadas. Essa abordagem revelou a capacidade de separar bactérias resistentes e não resistentes, evidenciando possíveis identificações perdidas pelos métodos tradicionais de busca proteômica. Essas identificações, frequentemente omitidas, podem estar relacionadas a modificações pós-traducionais e substituições de aminoácidos, possivelmente envolvidas na resistência antimicrobiana. Esta descoberta é útil para compreensão mais aprofundada dos mecanismos de adaptação bacteriana aos agentes antimicrobianos, indicando a necessidade de investigações adicionais nesta área.

Ao explorarmos cada vez mais essas modificações em proteínas associadas à resistência, podemos ganhar *insights* valiosos sobre os processos moleculares subjacentes e, assim, identificar alvos potenciais para intervenções terapêuticas direcionadas. Contudo, ainda são necessários mais estudos para uma compreensão aprofundada das modificações proteicas, sendo fundamental para desenvolver estratégias mais eficazes no combate a estados patológicos, incluindo os relacionados à resistência.

REFERÊNCIAS

1. Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations [Internet]. 2016 [citado 24 setembro de 2022]. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
2. Santos N de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Contexto - Enferm. 2004;13:64–70. DOI: 10.1590/S0104-07072004000100009.
3. Concha NO, Rasmussen BA, Bush K, Herzberg O. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. Struct Lond Engl 1993. 15 de julho de 1996;4(7):823–36. DOI: 10.1016/S0969-2126(96)00111-5.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 [Internet]. Atlanta: CDC; 2013 [citado 4 fevereiro de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
5. Wellcome Collection. The Path of Least Resistance [Internet]. 2016 [citado 22 setembro de 2022]. Disponível em: <https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v/items>
6. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2016 [citado 21 setembro de 2022]. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204274/WHO_DGO_AMR_2016.1_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. United Nations. Political Declaration of the High-Level Meeting of the General Assembly on Antimicrobial Resistance: 22 de setembro de 2016;6. Disponível em: <https://digitallibrary.un.org/record/842813?v=pdf>
8. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 12 de fevereiro de 2022;399(10325):629–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
9. Organização Pan-Americana da Saúde. Enfrentando a resistência antimicrobiana durante a pandemia de COVID-19: práticas e lições aprendidas [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2022 [citado 25 setembro de 2022]. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55936/OPASCDEAMRCOVID19220006_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 [Internet]. Atlanta: CDC; 2019 [citado 23 setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Impact of COVID-19 on Antimicrobial Resistance in the United States, 2022 [Internet]. Atlanta: CDC; 2022 [citado 2022 jul 28]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/covid19-impact-report-508.pdf>

12. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Plano Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária [Internet]. Brasília: MAPA; 2018 [citado 21 setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/PANBRdez2018.pdf>
13. Pillonetto M, Jordão RT de S, Andraus GS, Bergamo R, Rocha FB, Onishi MC, et al. The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. *Front Public Health* [Internet]. 2021 [citado 10 de agosto de 2022];8. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.575536>
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e de Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde: 2023-2027 [Internet]. Brasília: ANVISA; 2023 [citado 18 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/pnpciras-e-pan-servicos-de-saude/pan-servicos-de-saude-2023-2027-final-15-12-2023.pdf>
15. Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. março de 2016;16(3):280. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00547-4.
16. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Epidemiological Update: Antimicrobial Resistance Surveillance in the Americas. [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2012 [citado em 24 de setembro de 2022]. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50734/EpiUpdate19diciembre2012_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
17. Tartari E, Hopman J, Allegranzi B, Gao B, Widmer A, Cheng VCC, et al. Perceived challenges of COVID-19 infection prevention and control preparedness: A multinational survey. *J Glob Antimicrob Resist*. setembro de 2020;22:779–81. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.06.015.
18. Rawson TM, Moore LSP, Castro-Sanchez E, Charani E, Davies F, Satta G, et al. COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1º de julho de 2020;75(7):1681–4. DOI:10.1093/jac/dkaa194.
19. Li J, Wang J, Yang Y, Cai P, Cao J, Cai X, et al. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 22 de setembro de 2020;9(1):153. DOI:10.1186/s13756-020-00876-2.
20. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*. março de 2021;10(3):373. DOI:10.3390/pathogens10030373.
21. Leal NC, Campos TL, Rezende AM, Docena C, Mendes-Marques CL, de Sá Cavalcanti FL, et al. Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. *Front Microbiol* [Internet]. 2020

- [citado 26 de setembro de 2022];11. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01176>
22. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 1º de março de 2010;35(3):219–26. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.11.006.
 23. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter Baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clin Infect Dis*. 15 de abril de 2008;46(8):1254–63. DOI:10.1086/528862.
 24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. [Internet]. Brasília: ANVISA; 2020. [Citado 18 janeiro de 2024]. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf
 25. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 27 de fevereiro de 2017. [Citado 4 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos> [citado 4 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>
 26. World Health Organization. Bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. [internet]. 17 de maio de 2024 [Citado 01 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
 27. Da Silva GJ, Domingues S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*. 21 de novembro de 2017;6(4):28. DOI:10.3390/antibiotics6040028.
 28. Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis*. 8 de abril de 2005;5:24. DOI:10.1186/1471-2334-5-24.
 29. Falcone M, Tiseo G, Nicastro M, Leonildi A, Vecchione A, Casella C, et al. Cefiderocol as Rescue Therapy for *Acinetobacter baumannii* and Other Carbapenem-resistant Gram-negative Infections in Intensive Care Unit Patients. *Clin Infect Dis*. 1º de junho de 2021;72(11):2021–4. DOI:10.1093/cid/ciaa1163.
 30. Abdul-Mutakabbir JC, Alosaimy S, Morrisette T, Kebriaei R, Rybak MJ. Cefiderocol: A Novel Siderophore Cephalosporin against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2020;40(12):1228–47. DOI:10.1002/phar.2480.
 31. Parsels KA, Mastro KA, Steele JM, Thomas SJ, Kufel WD. Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *J Antimicrob Chemother*. 1º de junho de 2021;76(6):1379–91. DOI:10.1093/jac/dkaa591.

32. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* fevereiro de 2021;21(2):226–40. DOI:10.1016/S1473-3099(20)30497-5.
33. Choby JE, Ozturk T, Satola SW, Jacob JT, Weiss DS. Widespread cefiderocol heteroresistance in carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Lancet Infect Dis.* maio de 2021;21(5):597–8. DOI:10.1016/S1473-3099(21)00156-5.
34. Choby JE, Ozturk T, Satola SW, Jacob JT, Weiss DS. Does cefiderocol heteroresistance explain the discrepancy between the APEKS-NP and CREDIBLE-CR clinical trial results? *Lancet Microbe.* dezembro de 2021;2(12):e648–9. DOI:10.1016/S2666-5247(21)00242-0.
35. Ren X, Palmer LD. *Acinetobacter* Metabolism in Infection and Antimicrobial Resistance. *Infect Immun.* 16 de maio de 2023;91(6):e00433-22. DOI:10.1128/iai.00433-22.
36. Afzal-Shah M, Villar HE, Livermore DM. Biochemical characteristics of a carbapenemase from an *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother.* janeiro de 1999;43(1):127–31. DOI:10.1093/jac/43.1.127.
37. Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodrigues E, et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* junho de 1996;17(6):366–8. DOI:10.1017/S0899821996000576.
38. Chagas T, Rangel K, De-Simone S. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Latin America. Em 2024. DOI: 10.5772/intechopen.1003713.
39. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* julho de 2003;41(7):3403–6. DOI:10.1128/JCM.41.7.3403-3406.2003.
40. Deglmann RC, Kobs VC, Oliveira D de, Burgardt P, França PHC de, Pillonetto M. Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop [Internet].* 27 de junho de 2019 [citado 28 de setembro de 2022];52. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/ksmQFndJGKWgHXFLScbyhjk/?lang=en>
41. Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APD, et al. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* dezembro de 2014;58(12):7592–4. DOI:10.1128/AAC.04309-14.
42. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* dezembro de 2013;77(4):337–40.

DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.006.

43. Camargo CH, Yamada AY, Nagamori FO, de Souza AR, Tiba-Casas MR, de Moraes França FA, et al. Clonal spread of ArmA- and OXA-23-coproducing *Acinetobacter baumannii* International Clone 2 in Brazil during the first wave of the COVID-19 pandemic. *J Med Microbiol.* 2022;71(4):001509. DOI:10.1099/jmm.0.001509.
44. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 05/2021 - Resistência Microbiana na Pandemia da COVID-19 [Internet]. Brasília: ANVISA; 2021 [citado em 28 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.saude.df.gov.br/documents/37101/0/nota-tecnica-gvims-ggtes-anvisa-no-05-2021-resistencia-microbiana-na-pandemia-da-covid-19.pdf/47f0c888-ac59-2a7f-b845-505408b3e6dd?t=1683292039746>
45. Kiffer CRV, Rezende TFT, Costa-Nobre DT, Marinonio ASS, Shiguenaga LH, Kulek DNO, et al. A 7-Year Brazilian National Perspective on Plasmid-Mediated Carbapenem Resistance in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Complex and the Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on Their Occurrence. *Clin Infect Dis.* 1º de julho de 2023;77(Supplement_1):S29–37. DOI:10.1093/cid/ciad032
46. American Society Microbiology (ASM) Microbe 2022 | Presentation [Internet]. [citado 28 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/10522/presentation/2443>
47. Sales L, Meurer I, Garcia P. Prevalência de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos isolado de amostras de aspirado traqueal de pacientes hospitalizados. *Rev Cereus.* 10 de abril de 2024;16:252–64. DOI: 10.18605/2175-7275/cereus.v16n1p252-264
48. Almasaudi SB. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci.* 11 de fevereiro de 2016;25(3):586–96. DOI:10.1016/j.sjbs.2015.07.003.
49. Esterly JS, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH. Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter Baumannii*. *Ann Pharmacother.* fevereiro de 2011;45(2):218–28. DOI:10.1345/aph.1P144.
50. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol IJMM.* agosto de 2013;303(6–7):287–92. DOI:10.1345/aph.1P144.
51. Vázquez-López R, Solano-Gálvez SG, Juárez Vignon-Whaley JJ, Abello Vaamonde JA, Padró Alonzo LA, Rivera Reséndiz A, et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics.* abril de 2020;9(4):205. DOI:10.3390/antibiotics9040205.
52. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Wang J, Thompson PE, Li J. Teaching ‘Old’ Polymyxins New Tricks: New-Generation Lipopeptides Targeting Gram-Negative ‘Superbugs’. *ACS Chem Biol.* 16 de maio de 2014;9(5):1172–7. DOI:10.1021/cb500068g.

53. Vourli S, Frantzeskaki F, Meletiadis J, Stournara L, Armaganidis A, Zerva L, et al. Synergistic interactions between colistin and meropenem against extensively drug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ICU patients. *Int J Antimicrob Agents*. junho de 2015;45(6):670–1. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.011
54. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev*. julho de 2008;21(3):449–65. DOI:10.1128/CMR.00014-08.
55. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Res Int*. 2015;2015:679109. DOI:10.1155/2015/679109.
56. Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Médica Bras*. 2009;55:752–9. DOI: 10.1590/S0104-42302009000600023
57. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. junho de 2016;30(2):391–414. DOI:10.1016/j.idc.2016.01.006.
58. Kinoshita Y, Yakushiji F, Matsui H, Hanaki H, Ichikawa S. Study of the structure-activity relationship of polymyxin analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. 1º de setembro de 2018;28(16):2713–6. DOI:10.1016/j.bmcl.2018.06.053.
59. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*. 3 de abril de 2015;31(4):707–21. DOI:10.1185/03007995.2015.1025008.
60. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 15 de junho de 2016;80(3):629–61. DOI:10.1128/MMBR.00078-15.
61. Trimble MJ, Mlynářčík P, Kolář M, Hancock REW. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. outubro de 2016;6(10):a025288. DOI:10.1101/cshperspect.a025288.
62. Fernández L, Álvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Kocíncová D, Lam JS, et al. Characterization of the Polymyxin B Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. janeiro de 2013;57(1):110–9. DOI:10.1128/AAC.00666-12.
63. Hancock REW. Alterations in Outer Membrane Permeability. *Annu Rev Microbiol*. 1984;38(1):237–64. DOI:10.1146/annurev.mi.38.100384.001325.
64. Hancock RE, Bell A. Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. dezembro de 1988;7(6):713–20. DOI:10.1007/BF01962203.
65. Hancock RE. Peptide antibiotics. *The Lancet*. 8 de fevereiro de 1997;349(9049):418–22. DOI:10.1016/S0140-6736(96)10338-5.
66. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the

- PmrAB Two-Component System. *Antimicrob Agents Chemother.* setembro de 2009;53(9):3628–34. DOI:10.1128/AAC.00035-09.
67. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1º de junho de 2011;37(6):525–30. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.002.
 68. Purcell AB, Voss BJ, Trent MS. Diacylglycerol Kinase A Is Essential for Polymyxin Resistance Provided by EptA, MCR-1, and Other Lipid A Phosphoethanolamine Transferases. *J Bacteriol.* 204(2):e00498-21. DOI:10.1128/JB.00498-21.
 69. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother.* dezembro de 2010;54(12):4971–7. DOI:10.1128/AAC.00643-10.
 70. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, et al. Colistin-Resistant, Lipopolysaccharide-Deficient *Acinetobacter baumannii* Responds to Lipopolysaccharide Loss through Increased Expression of Genes Involved in the Synthesis and Transport of Lipoproteins, Phospholipids, and Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother.* janeiro de 2012;56(1):59–69. DOI:10.1128/AAC.00551-11.
 71. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion Sequence ISAb11 Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii* ▽. *Antimicrob Agents Chemother.* junho de 2011;55(6):3022–4. DOI:10.1128/A
 72. Liu YY, Chandler CE, Leung LM, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, et al. Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by mcr-1 in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 24 de maio de 2017;61(6):e00580-17. DOI:10.1128/AAC.00580-17.
 73. Nota Técnica Conjunta CGLAB, BrCAST e ANVISA: testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp. 2021 [Internet]. 2021 [citado 18 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/NOTA-TECNICA-ACINETOBACTER-2021.pdf>
 74. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. *J Clin Microbiol.* abril de 2019;57(4):e01390-18. DOI:10.1128/JCM.01390-18.
 75. Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, Kranich J, Carneiro GIB, Arend LNVS, et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janeiro de 2020;96(1):114910. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910.
 76. Pasteran F, Danze D, Menocal A, Cabrera C, Castillo I, Albornoz E, et al. Simple Phenotypic Tests To Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 17 de dezembro de 2020;59(1):e01701-20. DOI:10.1128/JCM.01701-20.

77. Pillonetto M, Kulek DN, Lemke AG, Andraus GS, Becker GN. Blue-Poli (BP): an accessible and rapid method for detecting colistin resistance in Enterobacterales. *Braz J Microbiol.* 29 de outubro de 2022;53(4):2195–7. DOI:10.1007/s42770-022-00638-6.
78. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. *J Antimicrob Chemother.* 1º de dezembro de 2018;73(12):3359–67. DOI:10.1093/jac/dky352.
79. Carvalho PC, Carvalho M da GC, Degraive W, Lilla S, De Nucci G, Fonseca R, et al. Differential protein expression patterns obtained by mass spectrometry can aid in the diagnosis of Hodgkin's disease. *J Exp Ther Oncol.* 2007;6(2):137–45. PMID: 17407972.
80. Fischer J de S da G, Liao L, Carvalho PC, Barbosa VC, Domont GB, Carvalho M da G da C, et al. Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. *J Proteomics.* março de 2010;73(5):1018–27. DOI:10.1016/j.jprot.2010.01.003.
81. Bastos PAD, da Costa JP, Vitorino R. A glimpse into the modulation of post-translational modifications of human-colonizing bacteria. *J Proteomics.* 30 de janeiro de 2017;152:254–75. DOI:10.1016/j.jprot.2016.10.013.
82. Gaviard C, Broutin I, Cosette P, Dé E, Jouenne T, Hardouin J. Lysine Succinylation and Acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res.* 6 de julho de 2018;17(7):2449–59. DOI:10.1021/acs.jproteome.8b00245.
83. Guo J, Wang C, Han Y, Liu Z, Wu T, Liu Y, et al. Identification of Lysine Acetylation in *Mycobacterium abscessus* Using LC–MS/MS after Immunoprecipitation. *J Proteome Res.* 5 de agosto de 2016;15(8):2567–78. DOI:10.1021/acs.jproteome.6b00377.
84. Gaviard C, Cosette P, Jouenne T, Hardouin J. LasB and CbpD Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Carry Multiple Post-Translational Modifications on Their Lysine Residues. *J Proteome Res.* 01 de 2019;18(3):923–33. DOI:10.1021/acs.jproteome.8b00836.
85. Kersey PJ, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, Apweiler R. The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments. *PROTEOMICS.* 2004;4(7):1985–8. DOI:10.1002/pmic.200300626.
86. Link AJ, Carmack E, Yates JR. A strategy for the identification of proteins localized to subcellular spaces: Application to *E. coli* periplasmic proteins. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* janeiro de 1997;160(1–3):303–16. DOI:10.1016/S0168-1176(96)04405-0.
87. Santos MDM, Lima DB, Fischer JSG, Clasen MA, Kurt LU, Camillo-Andrade AC, et al. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nat Protoc.* julho de 2022;17(7):1553–78. DOI:10.1038/s41596-022-00682-3.
88. Silva ARF, Lima DB, Leyva A, Duran R, Batthyany C, Aquino PF, et al. DiagnoProt: a tool for discovery of new molecules by mass spectrometry. *Bioinformatics.* 15 de junho de 2017;33(12):1883–5. DOI:10.1093/bioinformatics/btx032.

89. Carvalho PC, Fischer J de S da G, Degrave WM, Carvalho M da G da C. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. *J Bras Patol E Med Lab* [Internet]. dezembro de 2006 [citado 16 de dezembro de 2016];42(6). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000600005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
90. Anhalt JP, Fenselau Catherine. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*. 1º de fevereiro de 1975;47(2):219–25. DOI: 10.1021/ac60352a007
91. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 1º de julho de 2017;138:20–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.09.003
92. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. agosto de 1988;2(8):151–3. DOI: 10.1002/rcm.1290020802
93. Karas Michael, Hillenkamp Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 15 de outubro de 1988;60(20):2299–301. DOI: 10.1021/ac00171a028
94. Sloan A, Wang G, Cheng K. Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. *Clin Chim Acta*. 1º de outubro de 2017;473(473):180–5. DOI: 10.1016/j.cca.2017.08.014
95. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem*. 1º de janeiro de 2015;61(1):100–11. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
96. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 1º de março de 2012;36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
97. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [citado 15 de maio de 2023];6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525378/>
98. Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clin Chem Lab Med CCLM*. 1º de fevereiro de 2013;51(2):257–70. DOI: 10.1515/cclm-2012-0564
99. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Chapter 6 - Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. Em: *Advances in Applied Microbiology* [Internet]. Academic Press; 2010 [citado 26 de janeiro de 2024]. p. 149–84. (*Advances in Applied Microbiology*; vol. 71). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216410710066>
100. Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends Anal Chem*. 1º de agosto de 2000;19(8):507–16. DOI: 10.1016/S0165-9936(00)00030-1
101. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-

- mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* novembro de 2010;5(11):1733–54.DOI: 10.2217/fmb.10.127
102. Lo CI, Fall B, Sambe-Ba B, Diawara S, Gueye MW, Mediannikov O, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Clinical Microbiology at Hôpital Principal de Dakar, Senegal (West Africa). *PloS One.* 2015;10(12):e0145889.DOI: 10.1371/journal.pone.0145889
 103. Murray PR. What Is New in Clinical Microbiology—Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Mol Diagn JMD.* setembro de 2012;14(5):419–23. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.06.002
 104. Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol.* julho de 2010;28(7):710–21. DOI: 10.1038/nbt.1661
 105. Hoffmann E de, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications.* 3 edition. Chichester: Wiley-Interscience; 2007. 502 p. [Citado 20 junho de 2024]. Disponível em: <https://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>
 106. Munson MSB, Field FH. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *J Am Chem Soc.* 1º de junho de 1966;88(12):2621–30.DOI: 10.1021/ja00964a001
 107. Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. *J Chem Soc Chem Commun.* 1º de janeiro de 1981;(7):325–7.DOI: 10.1039/C39810000325
 108. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science.* 6 de outubro de 1989;246(4926):64–71.DOI: 10.1126/science.2675315
 109. Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL, et al. Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC–APCI-MS/MS. *Anal Chem.* 1º de setembro de 2000;72(17):4127–34.DOI: 10.1021/ac000399c
 110. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* setembro de 1984;88(20):4451–9.DOI: 10.1021/j150664a002
 111. Cole RB, organizador. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications.* 2nd ed. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons; 2010. 847 p. [Citado 10 agosto de 2024] Disponível em: <https://download.e-bookshelf.de/download/0000/5756/64/L-G-0000575664-0002359204.pdf>
 112. Amad MH, Cech NB, Jackson GS, Enke CG. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J Mass Spectrom.* 2000;35(7):784–9.DOI: 10.1002/1096-9888(200007)35:7<784::AID-JMS27>3.0.CO;2-9
 113. Saallah S, Lenggoro W. Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent

- Advances and Applications. KONA Powder Part J. 28 de fevereiro de 2018;2018.DOI: 10.14356/kona.2018019
114. Monge ME, Fernández FM. An Introduction to Ambient Ionization Mass Spectrometry. 14 de novembro de 2014 [citado 29 de janeiro de 2024]; Disponível em: <https://books.rsc.org/books/edited-volume/43/chapter/51374/An-Introduction-to-Ambient-Ionization-Mass>
 115. Hoffmann E de, Stroobant V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons; 2013. 502 p.DOI: 10.1002/9780470033104
 116. Michalski A, Damoc E, Lange O, Denisov E, Nolting D, Müller M, et al. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. Mol Cell Proteomics MCP. março de 2012;11(3):O111.013698.DOI: 10.1074/mcp.O111.013698
 117. Pekar T, Blethrow JD, Schwartz JC, Merrihew GE, MacCoss MJ, Swaney DL, et al. A Novel Dual-Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer Improves the Analysis of Complex Protein Mixtures. Anal Chem. 15 de setembro de 2009;81(18):7757–65.DOI: 10.1021/ac901242v
 118. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, et al. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. Anal Chem. 1º de abril de 2006;78(7):2113–20.DOI: 10.1021/ac0518811
 119. Medina E, Pieper DH. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:3–33. DOI: 10.1007/82_2016_492
 120. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathog Basel Switz. 19 de março de 2021;10(3):373.DOI: 10.3390/pathogens10030373
 121. Guimarães DO, Momesso L da S, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quím Nova. 2010;33(3):667–79.DOI: 10.1590/S0100-40422010000300035
 122. Da Silva G, Domingues S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*. Antibiotics. 21 de novembro de 2017;6(4):28.DOI: 10.3390/antibiotics6040028
 123. Langford BJ, So M, Simeonova M, Leung V, Lo J, Kan T, et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. Lancet Microbe. janeiro de 2023;S266652472200355X.DOI: 10.1016/S2666-5247(22)00355-X
 124. Rizk NA, Zahreddine N, Haddad N, Ahmadih R, Hannun A, Bou Harb S, et al. The Impact of Antimicrobial Stewardship and Infection Control Interventions on *Acinetobacter baumannii* Resistance Rates in the ICU of a Tertiary Care Center in Lebanon. Antibiotics. 7 de julho de 2022;11(7):911.DOI: 10.3390/antibiotics11070911
 125. Perez LRR, Carniel E, Dalpiaz G, Vetter M, Narvaez GA, Dias CG. A four-year follow-up survey of antimicrobial resistance among *Acinetobacter baumannii* complex from inpatients in Southern Brazil. Am J Infect Control. dezembro de 2021;49(12):1503–

- 5.DOI: 10.1016/j.ajic.2021.07.015
126. da Silva KE, Maciel WG, Croda J, Cayô R, Ramos AC, de Sales RO, et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PloS One*. 2018;13(12):e0209367.DOI: 10.1371/journal.pone.0209367
 127. Tsakou F, Jersie-Christensen R, Jenssen H, Mojsoska B. The Role of Proteomics in Bacterial Response to Antibiotics. *Pharmaceuticals*. 27 de agosto de 2020;13(9):214.DOI: 10.3390/ph13090214
 128. Lima TB, Pinto MFS, Ribeiro SM, Lima LA, Viana JC, Júnior NG, et al. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *FASEB J*. abril de 2013;27(4):1291–303.DOI: 10.1096/fj.12-215699
 129. Foudraine DE, Strepis N, Stingl C, ten Kate MT, Verbon A, Klaassen CHW, et al. Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae* using proteogenomics. *Sci Rep*. 14 de junho de 2021;11(1):12472.DOI: 10.1038/s41598-021-91792-0
 130. Palmer AC, Kishony R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet*. abril de 2013;14(4):243–8.DOI: 10.1038/nrg3554
 131. Abouelhadid S, Raynes J, Bui T, Cuccui J, Wren BW. Characterization of Posttranslationally Modified Multidrug Efflux Pumps Reveals an Unexpected Link between Glycosylation and Antimicrobial Resistance. *Parkhill J, organizador. mBio*. 22 de dezembro de 2020;11(6):e02604-20.DOI: 10.1128/mBio.02604-20
 132. Wang P, Li RQ, Wang L, Yang WT, Zou QH, Xiao D. Proteomic Analyses of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates to Identify Drug Resistant Mechanism. *Front Cell Infect Microbiol*. 24 de fevereiro de 2021;11:625430.DOI: 10.3389/fcimb.2021.625430
 133. Cheah SE, Johnson MD, Zhu Y, Tsuji BT, Forrest A, Bulitta JB, et al. Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. *Sci Rep*. 19 de maio de 2016;6(1):26233.DOI: 10.1038/srep26233
 134. Santos MDM, Camillo-Andrade AC, Lima DB, Souza TACB, Fischer J de S da G, Valente RH, et al. DiagnoMass: A proteomics hub for pinpointing discriminative spectral clusters. *J Proteomics*. abril de 2023;277:104853.DOI: 10.1016/j.jprot.2023.104853
 135. Kong AT, Leprevost FV, Avtonomov DM, Mellacheruvu D, Nesvizhskii AI. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods*. maio de 2017;14(5):513–20.DOI: 10.1038/nmeth.4256
 136. Doellinger J, Schneider A, Hoeller M, Lasch P. Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction. *Mol Cell Proteomics MCP*. janeiro de 2020;19(1):209–22.DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001783

137. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* 1º de fevereiro de 2003;75(3):663–70.DOI: 10.1021/ac026117i
138. Hahne H, Pachl F, Ruprecht B, Maier SK, Klaeger S, Helm D, et al. DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments. *Nat Methods.* outubro de 2013;10(10):989–91.DOI: 10.1038/nmeth.2620
139. Kurt LU, Clasen MA, Santos MDM, Souza TACB, Andreassa EC, Lyra EB, et al. RawVegetable – A data assessment tool for proteomics and cross-linking mass spectrometry experiments. *J Proteomics.* agosto de 2020;225:103864.DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103864
140. Clasen MA, Kurt LU, Santos MDM, Lima DB, Liu F, Gozzo FC, et al. Increasing confidence in proteomic spectral deconvolution through mass defect. *Vitek O, organizador. Bioinformatics.* 15 de novembro de 2022;38(22):5119–20.DOI: 10.1093/bioinformatics/btac614
141. Clasen MA, Santos MDM, Kurt LU, Fischer J, Camillo-Andrade AC, Sales LA, et al. PatternLab V Handles Multiplex Spectra in Shotgun Proteomic Searches and Increases Identification. *J Am Soc Mass Spectrom.* 5 de abril de 2023;34(4):794–6.DOI: 10.1021/jasms.2023.794
142. Eng JK, Hoopmann MR, Jahan TA, Egertson JD, Noble WS, MacCoss MJ. A deeper look into Comet--implementation and features. *J Am Soc Mass Spectrom.* novembro de 2015;26(11):1865–74.DOI: 10.1007/s13361-015-1222-1
143. Carvalho PC, Fischer JSG, Xu T, Cociorva D, Balbuena TS, Valente RH, et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics.* abril de 2012;12(7):944–9.DOI: 10.1002/pmic.201100477
144. Abouelhadid S, Raynes J, Bui T, Cuccui J, Wren BW. Characterization of Posttranslationally Modified Multidrug Efflux Pumps Reveals an Unexpected Link between Glycosylation and Antimicrobial Resistance. *Parkhill J, organizador. mBio.* 22 de dezembro de 2020;11(6):e02604-20.DOI: 10.1128/mBio.02604-20

ANEXO I – CÓPIA DO ARTIGO PUBLICADO EM FORMATO PDF



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Beyond the identifiable proteome: Delving into the proteomics of polymyxin-resistant and non-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazilian hospitals

Amanda Dal Lin^{a,b,1}, Juliana de S. da G. Fischer^{a,1}, Marlon D.M. Santos^{a,c},
Amanda Caroline Camillo-Andrade^{a,c}, Louise Ulrich Kurt^a, Tatiana A.C.B. Souza^a,
Ana Beatriz Lyrio Lajas^a, Bernardina Rivera^c, Magdalena Portela^c, Rosario Duran^c,
Marcelo Távora Mira^b, Marcelo Pilonetto^{b,d,*}, Paulo Costa Carvalho^{a,**}

^a Laboratory for Structural and Computational Proteomics, Carlos Chagas Institute, Fiocruz – Paraná, Brazil

^b Laboratório Experimental Multiuso, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil

^c Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo/IIBCE, Montevideo, Uruguay

^d Laboratório Central do Estado do Paraná, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
DiagnoMass
Polymyxin
Acinetobacter baumannii
Resistant bacteria
ARM

ABSTRACT

This work discloses a unique, comprehensive proteomic dataset of *Acinetobacter baumannii* strains, both resistant and non-resistant to polymyxin B, isolated in Brazil generated using Orbitrap Fusion Lumos. From nearly 4 million tandem mass spectra, the software DiagnoMass produced 240,685 quality-filtered mass spectral clusters, of which PatternLab for proteomics identified 44,553 peptides mapping to 3479 proteins. Crucially, DiagnoMass shortlisted 3550 and 1408 unique mass spectral clusters for the resistant and non-resistant strains, respectively, with only about a third with sequences (and PTMs) identified by PatternLab. Further open-search attempts via FragPipe yielded an additional ~20% identifications, suggesting the remaining unidentified spectra likely arise from complex combinations of post-translational modifications and amino-acid substitutions. This highlights the untapped potential of the dataset for future discoveries, particularly given the importance of PTMs, which remain elusive to nucleotide sequencing approaches but are crucial for understanding biological mechanisms. Our innovative approach extends beyond the identifications that are typically subjected to the bias of a search engine; we discern which spectral clusters are differential and subject them to increased scrutiny, akin to spectral library matching by comparing captured spectra to themselves. Our analysis reveals adaptations in the resistant strain, including enhanced detoxification, altered protein synthesis, and metabolic adjustments.

Significance: We present comprehensive proteomic profiles of non-resistant and resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazilian Hospitals strains, and highlight the presence of discriminative and yet unidentified mass spectral clusters. Our work emphasizes the importance of exploring this overlooked data, as it could hold the key to understanding the complex dynamics of antibiotic resistance. This approach not only informs antimicrobial stewardship efforts but also paves the way for the development of innovative diagnostic tools. Thus, our findings have profound implications for the field, as far as methods for providing a new perspective on diagnosing antibiotic resistance as well as classifying proteomes in general.

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is a gram-negative coccobacillary bacterium,

increasingly recognized as a significant public health concern. *A. baumannii* is commonly found in hospital environments and can cause various infections, including hospital-acquired pneumonia (HAP),

* Correspondence to: Marcelo Pilonetto, Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, Curitiba, PR 80215-901, Brazil.

** Correspondence to: Paulo Costa Carvalho, R. Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, PR 81350-010, Brazil.

E-mail addresses: m.pilonetto@pucpr.br (M. Pilonetto), paulo@pcarvalho.com (P.C. Carvalho).

¹ Equal contributions

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.105012>

Received 19 July 2023; Received in revised form 21 September 2023; Accepted 21 September 2023

Available online 23 September 2023

1874-3919/© 2023 Published by Elsevier B.V.

ventilator-associated pneumonia (VAP), and bacteremia [1]. The emergence and spread of antibiotic resistance in *A. baumannii* are a complex phenomenon influenced by genetic and environmental factors. This microorganism is notorious for its ability to rapidly develop resistance to antibiotics, making it a challenging pathogen to treat [2].

Addressing bacterial resistance to antibiotics is crucial; therefore, continued research into new antibiotics, efficient vaccines, alternative treatments, faster and more sensitive diagnoses, and promoting the appropriate use of antibiotics (Antimicrobial Stewardship) to delay the development of resistance are essential [3]. Among the various types of antibiotics, Carbapenem was once considered the last therapeutic option for treating multidrug-resistant *A. baumannii* (MDR) infections. However, in recent years, isolates resistant to this class have emerged, leading to the clinical application of polymyxins. With the emergence of extensively drug-resistant and even pan-drug resistance, clinicians have even been forced to use polymyxin B and E (colistin), an antibiotic group that can do kidney and nerve damage, to combat these infections [4]. Brazilian researchers described the first outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* – CRAB, as early as 1999, which produced OXA-23 enzyme [5]. It's important to note that CRABs are always MDR isolates, having developed resistance to multiple antibiotic classes before becoming resistant to carbapenems. As an aggravator, the COVID-19 pandemic has led to an increase in infections by multidrug-resistant bacteria, further impacting the global scenario. Unfortunately, during the pandemic, the uncontrolled use of antimicrobials has accelerated the decrease of efficiency of these antibiotic classes as well [6].

In 2019, Murray's published data estimated deaths associated with bacterial antimicrobial resistance reaching 4.95 million, a figure seven times higher than the reports described by the Centers for Disease Control and Prevention in 2013 and O'Neill in 2016 [7,8]. Particularly alarming is the situation in the southern region of Brazil, where recent research revealed an extensive presence of drug-resistant *A. baumannii*; from 2017 to 2020, 659 isolates were analyzed [9]. Polymyxin B remained the only antimicrobial with in vitro efficacy. In another report, an outbreak of carbapenem-resistant strains in an intensive care unit was detailed [10], thus deepening our concerns. With escalating resistance, the necessity for stringent surveillance and conscientious antimicrobial stewardship becomes even more pressing.

Brazil, with its extensive population, diverse healthcare infrastructure, including the Unified Health System (SUS), and its network of Central Public Health Laboratories (LACENs), provides a unique setting for exploring the emergence and spread of antibiotic resistance in *A. baumannii*. This intricate assembly of public health services and diagnostic laboratories nationwide offers a comprehensive and nuanced perspective on the country's ongoing efforts to combat antibiotic resistance. With this as motivation, our data descriptor originates from the joint efforts of these systems and aims to contribute to a broader understanding of the molecular underpinnings of resistance and the drivers behind the emergence of multidrug-resistant strains within the country. Here, we provide and explore proteomic profiles of *A. baumannii* strains originating from the states of Paraná and Santa Catarina. It is important to note the escalating prevalence of polymyxin-resistant *A. baumannii* strains in Brazil, especially in this region. This trend urges a deeper understanding of these strains and underscores the need for novel therapeutic options. Such knowledge is crucial in devising innovative therapeutic strategies, surveillance control, and preserving the efficacy of our current antibiotic arsenal and thus should serve as an example for similar investigations worldwide [11].

Proteomics is a powerful tool for understanding local antibiotic-resistant bacteria, providing a comprehensive view of their proteome [12]. This information can identify specific proteins involved in antibiotic resistance and understand cellular changes in response to antibiotic exposure. Proteomics can also serve as a diagnostic tool to detect resistance-related proteins, such as beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes [13]. However, the presence of

these enzymes doesn't definitively indicate active resistance, which could be latent or suppressed under certain conditions [14]. Moreover, resistance could be conferred by post-translational modifications, which are undetectable by DNA sequencing approaches, and amino acid substitutions, which are frequently missed by proteomic search engines [15]. Current solutions, such as Bruker's MALDI Biotyper, exemplify the utility of mass spectrometry in bacterial diagnostics. However, these systems typically rely on single spectra, which limits their discriminative power for diagnosing resistant bacteria. In contrast, shotgun proteomics profiles provide a more expansive and detailed analysis of protein fragments, enhancing the discriminatory power when identifying and classifying bacterial strains. In this vein, the studies by Ping Wang et al. and Zhenbo Xu et al. provide comprehensive proteomic analyses of *Acinetobacter baumannii*, revealing significant differences between drug-resistant and drug-susceptible isolates, and identifying differentially expressed proteins that may influence drug resistance, particularly those located in the periplasmic or outer membrane of the cell [16,17].

This data descriptor presents proteomic profiles of polymyxin-resistant *A. baumannii* strains from Brazilian hospitals, highlighting regional variations. By cross-examining proteomic data across diverse strains and resistance profiles, our dataset uncovers unique evolutionary trends and adaptations under antibiotic pressure. These insights inform Antimicrobial Stewardship in Brazilian healthcare settings and can be instrumental in developing diagnostic tools and slowing the development of further resistance.

We utilized DiaMass [18] to investigate the proteomic data, grouping similar spectra into spectral clusters, transcending the limitations of traditional search engines that introduce bias towards identifiable portions of the provided sequence database. DiaMass interfaced with PatternLab for Proteomics V (PLV) for peptide spectrum matching [19] and FragPipe for open search [20], shortlisting spectral clusters unique to a biological condition. Notably, we aim to discover and highlight those unique mass spectral clusters that remain unidentified by both search engines, offering an unbiased perspective for comparing biological conditions and shedding light on potential biomarkers for understanding and combating drug resistance in *A. baumannii*. This methodology offers an unbiased perspective for comparing biological conditions and promises to shed light on potential biomarkers key in understanding and combating drug resistance in *A. baumannii*. As such, we argue that this is pivotal for surveillance purposes and can serve as a resource for the development and refinement of diagnostic tools. Such data can form the foundational blocks for integration with machine learning algorithms, predicting antibiotic resistance based on comprehensive proteomic profiles.

2. Methodology

2.1. Sample acquisition and preparation

We were granted permit A64AE41 from the Brazilian National System of Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge (SisGen), which authorized us to assess samples of *A. baumannii*. The bacterial strains (14 resistant and 14 non-resistant to polymyxin B) were obtained from the "Laboratório Central do Estado do Paraná". Stored at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) medium, the strains were thawed and streaked onto MacConkey agar medium using a 10 μL bacteriological loop. Following incubation for 24 h at 36°C , growth and isolate purity were assessed. Bacterial lysis was carried out following the SPEED protocol [21]. Subsequently, sample quantification was performed using the fluorometric Qubit assay, as per the manufacturer's instructions. One hundred micrograms of each sample were reduced with dithiothreitol (final concentration 10 mM) for 30 min at 60°C , cooled to room temperature (20°C) followed by alkylation with iodoacetamide (final concentration 30 mM) for 25 min. Finally, the samples were digested overnight with trypsin in a 1/50 (E/S) ratio at 37°C . The reaction was interrupted with trifluoroacetic acid (TFA) 10% (final concentration of

1%), followed by centrifugation for 15 min at 18,000 × g and again quantified by the fluorometric Qubit assay. Ten micrograms of each sample were desalted with Stop and Go Extraction Tips (Stage Tips) as described by Rappisilber and collaborators [22].

2.2. Mass spectrometry acquisition

The peptides were subjected to LC-MS/MS (Liquid chromatography with tandem mass spectrometry) analysis with an UltiMate 3000 (Thermo Fisher®) ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system coupled with an Orbitrap Fusion™ Lumos™ mass spectrometer (Thermo, San José), as follows. The peptide mixtures were loaded into a column (75 mm i.d., 30 cm long) packed in-house with a 3 μm ReproSil-Pur C18-AQ resin (Dr. Maisch) with a flow of 250 nL/min and subsequently eluted with a flow of 250 nL/min from 5% to 40% ACN in 0.1% formic acid in a 140 min gradient [23]. The mass spectrometer was set in data-dependent acquisition (DDA) mode to automatically switch between full-scan (MS) and MS/MS (MS2) acquisition. Survey MS spectra (from m/z 300–1500) were acquired in the Orbitrap analyzer with a resolution of 120,000 at m/z 200. The most intense ions captured in 2 s cycle time were chosen, excluding unassigned ones that had a 1+ charge state. The ions were sequentially isolated and fragmented using higher-energy collisional dissociation (HCD) with normalized energy of 30. The fragment ions were analyzed with a resolution of 15,000 at 200 m/z . The general mass spectrometric conditions were spray voltage, 2.5 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature of 250 °C; predictive automatic gain control (AGC) enable, and S-lens RF level of 40%. Mass spectrometer scan functions and nLC solvent gradients were regulated using the XCalibur 4.1 data system (Thermo, San José). Two technical replicates were acquired for each biological replicate.

2.3. Data analysis

2.3.1. Dataset quality control with rawvegetable 2.0

To ensure the quality control of our mass spectrometry data, especially between the technical replicates of the experiments, we utilized RawVegetable, a specialized software tool tailored for mass spectrometry data assessment [24]. This tool provided us with several key modules. The charge state chromatogram module, as well as the TopN density estimation module, enabled us to optimize chromatography. The TopN is particularly interesting, as it enables the control of how many MS/MS scans are being generated by cycle, which in turn helped us identify retention time intervals of under or over-sampling, facilitating necessary gradient adjustments. The chromatography reproducibility module allowed for pairwise comparisons between multiple experiments, ensuring the consistency and reliability of our data. And lastly, we were able to assess the quality of MS/MS spectra by looking at their Xrea scores [25] throughout the run and the precursor signal ratio distribution to analyze the fragmentation efficiency.

2.3.2. Protein and peptide identification with PatternLab for Proteomics V

We utilized PatternLab for Proteomics V (version 5.0.0.152) for peptide spectrum matching due to its proven reliability and accessibility [26]; the software is freely available at <http://patternlabforproteomics.org>. Data analysis followed the software's protocol [19], with the exception of the new search feature that enables multiplexed spectra identification through the Y.A.D.A. 3.0 deconvolution algorithm [26,27].

A. baumannii sequence (TG28175–5909 in total) were sourced from UniProt in March 2023, supplemented with 127 common mass spectrometry contaminants and searched using PLV's embedded Comet [28]. The search included semi-tryptic and fully-tryptic peptide candidates, allowing up to 2 missed cleavage sites. Variable modifications included oxidation of methionine and deamidation of asparagine and glutamine, while carbamidomethylation of cysteine was considered a fixed

modification.

Validation of peptide-spectrum matches (PSMs) was conducted using the Search Engine Processor (SEPro) integrated into PLV [29]. This aimed to generate a list of identifications with <1% false discovery rate (FDR) at the protein level. Identifications were grouped by charge state (2+ and ≥ 3+) and tryptic status, forming four distinct subgroups. Each group was sorted based on a Bayesian discriminator generated from XCorr, DeltaCN, DeltaPPM, and Peaks Matched values. A cutoff score was set to accept a 2% FDR at the peptide level, based on the number of labeled decoys. This process was independently performed on each data subset, resulting in an FDR independent of charge state or tryptic status. Additional requirements included a minimum sequence length of six amino-acid residues and PSMs with <10 ppm from the global identification average. One-peptide identifications (proteins identified with only one mass spectrum) with an XCorr of <2 were discarded, leading to FDRs at the protein level of <1% for all search results.

2.3.3. Differential proteomics

We utilized the “Peptide-Centric Differential Proteomic Analyzer” module, integrated within the XIC Explorer from PLV, to identify differentially abundant proteins. This module initiates the process by normalizing peptide quantification values according to the respective Total XIC for each run. For our analysis, we only considered peptides that were found in at least eight biological replicates (more than half) of both condition and exhibited a minimum absolute 2.3-fold change ($\log_2(1.2)$). Subsequently, a single-sample *t*-test was applied to the fold changes of peptides within each protein. By treating each peptide as an independent observation, we minimized error propagation, thereby enhancing the reliability of our analysis. Proteins with <3 peptides were not considered. The method also incorporates the principle of maximum parsimony for protein inference. To control the false discovery rate at the protein level, we employed the Benjamini-Hochberg procedure with a *q*-value threshold of 0.05. This rigorous approach ensures the reliable identification of differentially abundant proteins.

For proteins uniquely identified to a single condition, we only considered those present in at least five biological replicates.

2.3.4. Leveraging DiagonMass for exploratory and condition-specific spectral clustering

Shotgun proteomic data was processed using DiagonMass, a tool for spectral clustering. Parameters were set to optimize results: *BinOffset* at 112.456, *BinSize* at 1.0005, and *BinMaxMZ* at 1612.2055 defined the binning strategy. A *SimilarityThreshold* of 0.75 ensured high similarity within clusters. Only tandem mass spectra derived from precursors with charge states from 2+ to 5+ and having 10 and more peaks above 500 m/z were considered. *PrecursorTolerance* was set at 0.002 m/z to accommodate minor variations in precursor m/z values. *RetentionTimeTolerance* was set at 10 min, accounting for variability in liquid chromatography separation times. These parameters culminated in spectral clusters, which were then annotated using PatternLab V. Only spectral clusters belonging to five or more biological replicates of a given biological condition and not identified in any other biological replicate from the other condition were shortlisted for further evaluation using open-search. This threshold (5 out of 14) is justifiable based on a chi-squared statistical test, resulting in a *p*-value of 0.0135.

2.3.5. Annotating discriminative and unidentified spectral clusters through open-search

Open-search is a versatile method that allows for the identification of unexpected post-translational modifications and sequence variants. For this purpose, we employed FragPipe, a comprehensive tool for large-scale proteomic data analysis [20]. We adhered to its default parameters for open-search, using the same FASTA sequence database as previously mentioned. This approach aimed to maximize the identification and annotation of unidentified spectral clusters, thereby enhancing our understanding of the proteomic landscape under investigation.

3. Results

3.1. Mass spectral quality control

Initial comparisons of the full chromatograms between the technical replicates, as exemplified by Fig. 1, show not only the great similarity between the runs, but also very well-defined peaks, which indicates good reproducibility between the samples and great separation of the molecules. A full quality control analysis done in RawVegetable [24] also presents charged chromatograms, which indicate when most of the species of each individual charge eluted. In these samples, the charged chromatograms showed an abundance of 2+ and 3+ species throughout the whole chromatography, as expected of linear peptides, which also indicates a successful digestion of the samples.

The TopN density estimation of this data presented a satisfactory spectra acquisition throughout the experiment, with an average of 30 to 35 MS/MS scans per MS spectrum for most of the chromatography run, which translates in a great amount of spectra generated for the peptide identification step.

In terms of the quality of the MS/MS spectra generated, the distribution of Xrea scores showed that most MS/MS spectra had a good overall quality and indicated that the higher quality of spectrum was generated by the first 70 min of the run. The distribution of precursor signal ratio in the MS/MS scans shows that, in all samples, most of the scans had <2.5% of precursor signal left, which indicates a satisfactory fragmentation of the peptides, thus possibly generating better signal for the fragments and a better spectrum for the identification step.

All of these analyses demonstrate that the samples had very efficient LC-MS runs and no major issues were detected, which makes the data ready for further steps in the study.

A full summary of the quality control analysis, complete with images for each pair of replicates can be found in the supplementary material.

3.2. Protein identification and differential abundance analysis using PatternLab for proteomics

Our analysis with PatternLab for Proteomics V yielded 928,831 identified tandem mass spectra, which corresponded to 44,553 peptides

mapping to 3479 proteins across all analyses. The comprehensive list of proteins and peptides is available at 'All Proteins' and 'All Peptides' tabs of the Supplementary Spreadsheet, respectively. We identified 151 proteins that were exclusively identified in the resistant strains, considering only those found in five or more biological replicates specific to that condition (see 'Unique Resistant' tab). Conversely, a single protein (A0A0D5YDM4, Signal peptide) was exclusively identified in the non-resistant condition. We shortlisted 241 proteins identified in both conditions but exhibiting increased abundance in the resistant strains ('Up Resistant' tab), and 3 with increased abundance in the non-resistant strains ('Up Non-Resistant' tab).

3.3. Discriminant clusters via DiagnoMass

DiagnoMass was employed to cluster spectra based on precursor's charge state, m/z , and spectral angle. Not all spectra were assigned to clusters; for instance, only spectra with 10 or more m/z peaks above 500 were considered, and clusters had to contain at least two mass spectra. Our full dataset comprised 3,884,700 tandem mass spectra generated from both resistant and non-resistant strains. Of these, DiagnoMass considered 1,535,653 for generating the clusters, resulting in a total of 240,685 spectral clusters. Given that PatternLab identified a total of 44,553 peptides across all experiments, which could theoretically translate to around 89,106 spectral clusters (assuming that typically the same peptide is observed with 2 charge states), it's evident that the identified peptides explain only a little more than a third of the spectral clusters. This leaves a significant amount of information unexplored.

We propose that the most relevant information, not only in our work but also in other proteomic studies addressing conditions like cancer, might not be present in public databases. Alternatively, it might be tied up in post-translational modifications (PTMs) that are often missed by search engines due to their complexity or a combination of PTMs. These overlooked PTMs could play crucial roles in biological phenomena, such as enhancing bacterial resistance mechanisms as very well depicted in the work from Abouelhadid et al. [30].

Our dataset supports this hypothesis. For instance, the PCAs generated by PatternLab and DiagnoMass show a clear difference (Fig. 2). While PatternLab only considers information from identified peptides,

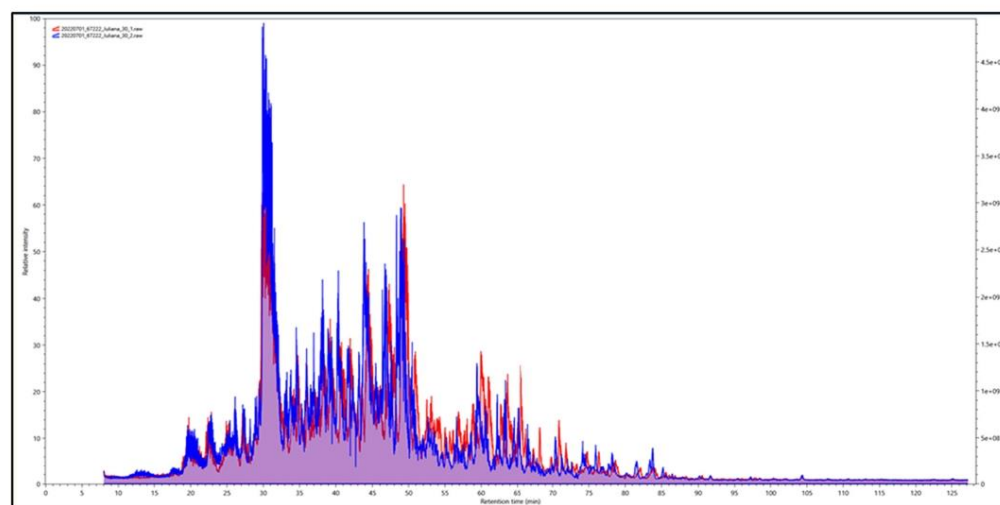


Fig. 1. Ion chromatogram comparison of technical replicates of *Acinetobacter baumannii* resistant to polymyxin B.

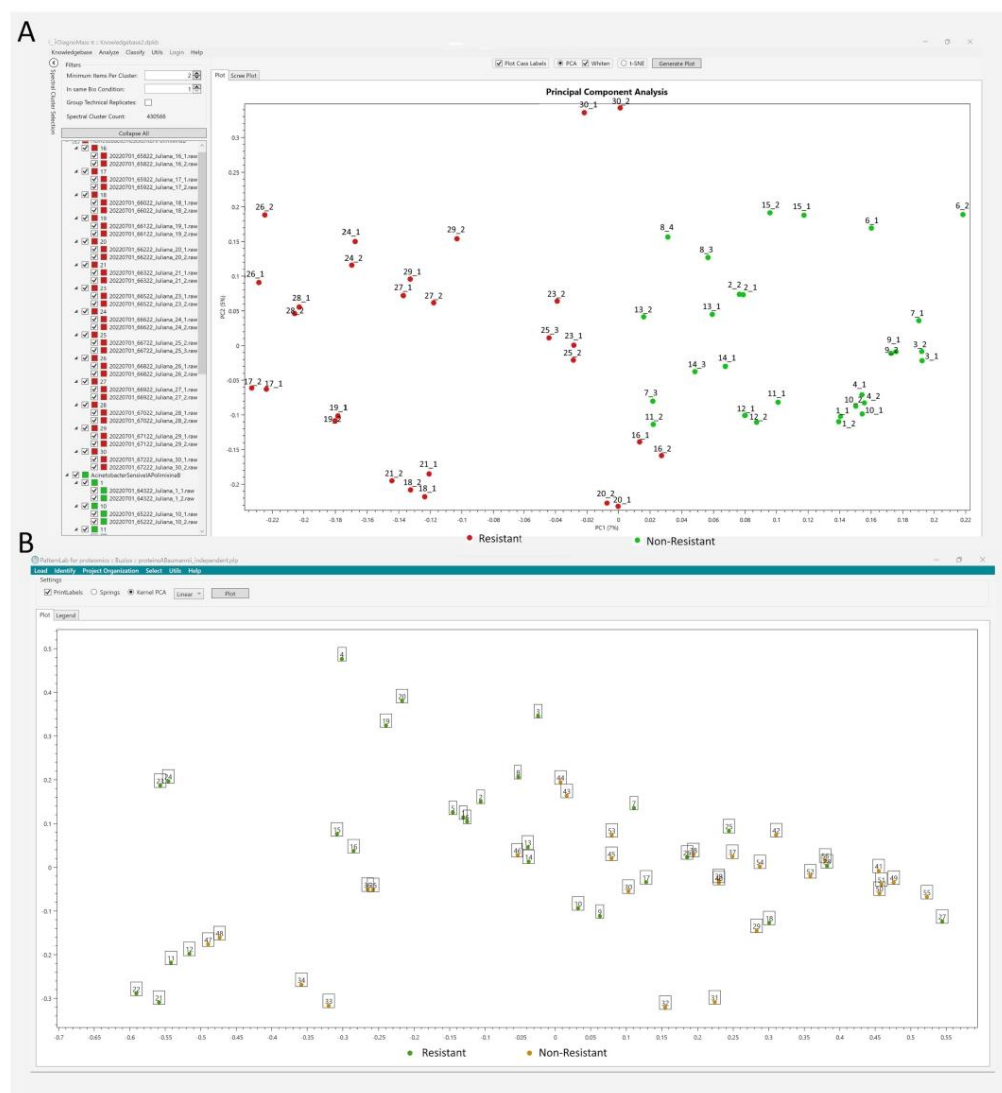


Fig. 2. Diagnomass vs PatternLab PCA plots of Polymyxin B Resistant *A. baumannii*. - This figure presents a side-by-side comparison of *A. baumannii* strains that are resistant and non-resistant to polymyxin B, as visualized through screenshots of Diagnomass (top) and PatternLab (bottom). The upper panel displays a Diagnomass-generated PCA scatterplot, generated from spectral clusters from peptides (identified or not) depicted as red (resistant) and green (non-resistant) dots, indicating a clear proteomic distinction between the strains. Conversely, the lower panel shows a PatternLab-generated plot, based solely on identified peptides, where the resistant and non-resistant strains are represented by green and light-brown dots, respectively, with no evident separation. The numbers in the upper panel are associated with file names. The numbers associated with the dots in the lower panel are consecutive numbers, serving as a visual aid to indicate the grouping of technical replicates. Specifically, pairs of sequential numbers are expected to group closely together, representing technical replicates of the same sample. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

DiagnoMass bases its analysis on spectral clusters. This difference in approach allows DiagnoMass to reveal information that is typically missed by conventional proteomics workflows, thereby providing a more comprehensive understanding of the biology at hand. Importantly, both PatternLab and DiagnoMass were developed by our group, utilizing the same underlying libraries. This ensures consistency in the analytical approach and gives us confidence in the reliability and validity of the DiagnoMass approach.

Utilizing DiagnoMass, we generated a heatmap and histogram, focusing on clusters derived from spectra found in at least five instances of the same biological condition (Fig. 3). This analysis suggests a correlation within the proteomic profiles of the resistant and non-resistant strains. As indicated in Fig. 3, DiagnoMass shortlisted 3550 and 1408 clusters exclusive to the resistant and non-resistant strains, respectively. Out of these, PatternLab could confidently identify spectra from only 1281 and 193 clusters, respectively. A detailed manual review indicates the presence of numerous high-quality, yet unidentified, mass spectra. For instance, we present an example of a consensus mass spectrum from cluster 12,192, originating from 15 tandem mass spectra distributed among 10 biological replicates of the Resistant form and found in no non-resistant form. This consensus spectrum originates from parent ions

with a 3+ charge and an m/z of 478.608; all of them remained unidentified (Fig. 4). Motivated by these findings, we exported all unidentified spectra from the unique clusters for further analysis using FragPipe, an open-search tool designed to search for variants not found in our sequence database. The exported mass spectra are provided in Supplementary2-UnidentifiedResistant.mgf and Supplementary3-UnidentifiedNonResistant.mgf.

3.4. Unveiling hidden Proteomic profiles: the power of open-search

Employing FragPipe's open-search capabilities, we identified 1004 peptides originating from the 3550 clusters exclusive to the resistant strains. These results underscore the value of integrating complementary search strategies alongside the prevalent peptide spectrum matching approach in proteomic identification. However, they also highlight the potential for further refinement in current proteomic identification tools. We speculate that the unidentified mass spectra may predominantly stem from peptides bearing a combination of post-translational modifications (PTMs) and amino acid substitutions. The peptides identified by FragPipe are made available in the 'Open-Search Resistant' tab of the Supplementary Spreadsheet.

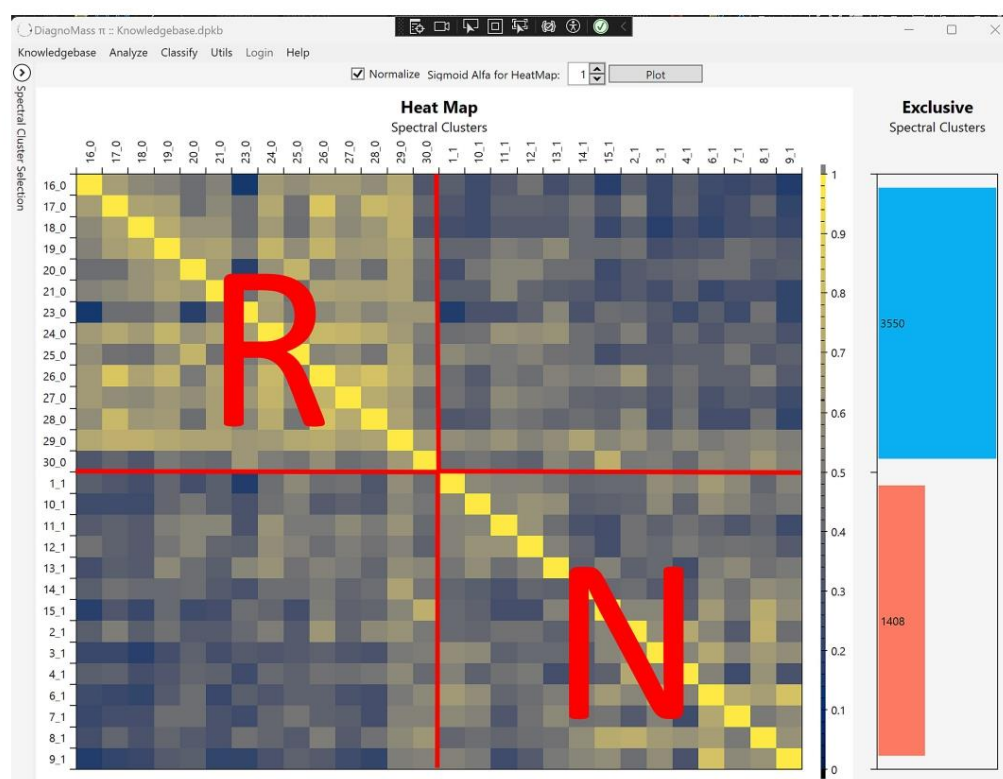


Fig. 3. Heatmap and Histogram of Spectral Clusters - This figure presents a heatmap of all bacterial samples analyzed in the study, generated using DiagnoMass. The heatmap visualizes the similarity in proteomic profiles between each pair of samples, with colour intensity indicating the degree of similarity. On the right, two bars represent the number of spectral clusters unique to each condition, i.e., the resistant (blue) and non-resistant (red) bacteria. The figure illustrates the significant differences in the proteomic profiles, especially the greater abundance in unique spectral clusters in the resistant condition, highlighting the presence of numerous discriminative and yet unidentified mass spectral clusters. The results underscore the potential of this overlooked data in understanding antibiotic resistance. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

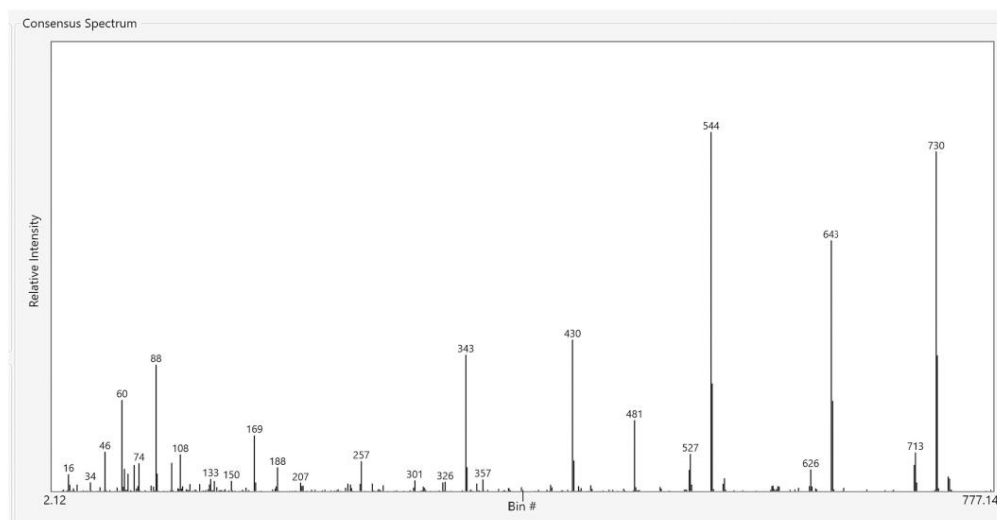


Fig. 4. Consensus Spectrum Illustration - The figure above presents a consensus binned spectrum, as provided by DiagonMass, generated through the averaging of intensity values for all mass spectral peaks within a specific spectral cluster. The y-axis denotes relative intensity, while the x-axis represents the corresponding mass spectral bin number. This consensus spectrum provides a comprehensive representation of the spectral cluster's characteristic features.

4. Discussion

4.1. Importance of polymyxin-resistance in CRAB

Carbapenem drugs have been broadly used to treat serious gram-negative infections in the 1990's and 2000's. Unfortunately, carbapenem-resistant strains have been increasingly isolated in Brazil and worldwide [31,32]. One of the last-resort treatments for CRABs is polymyxin and ceftiderocol. However, the latter is not available in Brazil and many other low- and middle-income countries. So, polymyxin is of prominent importance to treat this multi-drug resistant organism. The empirical use and abuse of polymyxin during COVID-19 to treat CRABs, precluded outbreaks of polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Since the laboratory test to evaluate polymyxin susceptibility needs a broth microdilution method, not easily available at microbiology labs in LMIC, alternative methods are welcome.

4.2. Proteins exclusively identified or more abundant in the resistant strains

The intricate network of proteins in polymyxin B-resistant *A. baumannii* presents a multifaceted portrait of the mechanisms underlying antibiotic resistance. Each protein, with its unique identifier, contributes to a narrative of adaptation and resilience in the face of antibiotic stress.

Among the proteins exclusively identified in the resistant strain we spotlight the Aldehyde dehydrogenase family protein (A0A429MLH1). By enhancing the bacterium's detoxification capabilities, it serves as a protective shield against the stress induced by polymyxin B. This shield is further fortified by the Glutamate-cysteine ligase (A0A3R9TSX1), which synthesizes glutathione, a molecule crucial for maintaining cellular redox balance and detoxifying reactive oxygen species. Together, these proteins form the bacterium's first line of defense against the antibiotic.

Simultaneously, the bacterium is also adjusting its protein synthesis,

as suggested by the presence of the 16S rRNA (Cytosine(1402)-N (4))-methyltransferase (A0A3R9RYT7). This alteration in protein synthesis could be a response to the changes in the bacterium's metabolic and transport processes, indicated by the presence of the D-lactate dehydrogenase (A0A429MKP4) and the ATP-binding cassette domain-containing protein (A0A3R9TP97). By adjusting these processes, the bacterium is likely optimizing its resources to withstand the effects of polymyxin B.

Further supporting this optimization are the Bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase (A0A429MRU0) and the Malate dehydrogenase (quinone) (A0A429MNJ3). These enzymes could be indicative of metabolic adjustments in the resistant strain, fine-tuning its energy production to cope with the antibiotic stress.

These mechanisms, notwithstanding, is further supported by several other proteins in our results that were shortlisted as having increased statistical abundance in the resistance strain and are also henceforth discussed. The ATP synthase gamma chain (V5VHZ7) and ATP synthase subunit b (V5VHG5) are integral components of the cell's energy production machinery. As part of the ATP synthase complex, these molecular motors drive the synthesis of ATP, the primary energy currency of the cell. Their increased abundance in the resistant strain suggests an increased demand for energy, likely to fuel various resistance mechanisms. This is not an isolated phenomenon, but rather a component of a broader response involving numerous other proteins.

For instance, the long-chain fatty acid transporter (A0A3R9RY45) and the RND transporter (A0A3R9S1X2) exhibit increased abundance in the resistant strain. These proteins facilitate the transport of molecules across the cell membrane. Their increased abundance could be associated with the efflux of polymyxin B from the bacterial cell, suggesting a concerted effort by the bacterium to physically expel the antibiotic from its interior. This strategy likely requires a significant amount of energy, hence the increased abundance of ATP synthase proteins.

In addition to these transporters, several proteins involved in protein synthesis and folding also exhibit increased abundance in the resistant strain. These include various ribosomal proteins such as 50S ribosomal

protein L5 (A0A3R9U554), 50S ribosomal protein L4 (V5V9M5), and 30S ribosomal protein S1 (V5VDL1). The ribosome, the cellular machinery responsible for protein synthesis, is likely operating at an increased rate in the resistant strain. This could be a response to the need for more resistance-related proteins, or a general increase in protein synthesis as part of the stress response.

Molecular chaperones like DnaK (A0A3R9S7E3, A0A3R9S0W4) and chaperonin GroEL (V5VAH2) also exhibit increased abundance in the resistant strain. These proteins assist in the folding of newly synthesized proteins and help maintain protein homeostasis under stress conditions. Their up-regulation suggests an increased need for protein quality control mechanisms in the resistant strain, possibly due to the exacerbated rate of protein synthesis.

The cell wall and membrane of the bacterium also play a pivotal role in resistance. Several proteins involved in cell wall/membrane biogenesis exhibit increased abundance in the resistant strain, including the cell division protein FtsZ (A0A429MC99) and the lytic transglycosylase (A0A3R9S3W6). Changes in the cell wall/membrane could affect the binding of polymyxin B, thus contributing to resistance.

In addition to these, proteins involved in amino acid synthesis and metabolism, such as tryptophan-tRNA ligase (A0A3R9S100), cysteine synthase (A0A3R9TNT7), and threonine synthase (A0A429MJ25), also exhibit increased abundance in the resistant strain. This could be due to an increased demand for amino acids for protein synthesis, or it could be part of a broader metabolic adjustment in response to antibiotic stress.

The resistant strain also shows an increased abundance of proteins with yet uncharacterized functions, such as the DUF3108 domain-containing protein (A0A3R9UE05, A0A3R9TM67) and the DUF4198 domain-containing protein (A0A0D5YHU6). The roles of these proteins in resistance are not yet clear, but their increased abundance suggests that they might be involved in some way. Further studies are needed to elucidate their functions.

In conclusion, the increased abundance of these proteins in polymyxin B-resistant *A. baumannii* is a testament to the organism's resilience and adaptability. It underscores the intricate interplay of various cellular processes - from energy production and protein synthesis to transport mechanisms, stress response, cell wall/membrane biogenesis, and amino acid metabolism. Each protein, acting not in isolation but in concert with others, contributes to a finely tuned symphony of survival mechanisms. This complex and coordinated response highlights the bacterium's strategic adaptation to antibiotic stress, reminding us of the multifaceted nature of antibiotic resistance. It underscores the need for a holistic approach in the study of antibiotic resistance, one that appreciates the interconnectedness of various proteins and cellular processes. As we continue to unravel this complex web of interactions, we move closer to understanding the full breadth of strategies employed by bacteria in their fight for survival.

4.3. Proteins more abundant or exclusively identified in the non-resistant strains

In the non-resistant strain of *A. baumannii*, several proteins were exclusively identified, suggesting a different set of mechanisms at play compared to the resistant strain. The ExeM/NucH family extracellular endonuclease (A0A3R9S704) might be involved in DNA degradation or repair processes, potentially contributing to the bacterium's ability to maintain genomic integrity under non-stressful conditions.

The Lipoprotein-34 (NlpB) (A0A3R9SE74) and two proteins identified as signal peptides (A0A098SJD0 and A0A0D5YDM4) could be involved in protein localization and transport, ensuring that proteins are correctly delivered to their functional locations within the cell.

Interestingly, several proteins in the non-resistant strain are yet to be characterized (A0A0D5YLE7, A0A429MLR8, and V5VCQ2). Their roles in the non-resistant strain are not yet clear, but their exclusive presence suggests that they might be involved in some way. Further studies are needed to elucidate their functions.

4.4. Final remarks

In conclusion, while Peptide Spectrum Matching (PSM) continues to be the most widely adopted method for proteomic data analysis, providing a robust foundation for the identification of proteins, it's important to recognize the value of complementary approaches such as open-search methods and other search engine unbiased approaches for analyzing data such as DiagonMass. The latter can help uncover additional identifications that might otherwise be overlooked, albeit can be more error-prone. Despite these advancements, a significant portion of mass spectra remains unidentified. These elusive spectra, potentially carrying a combination of post-translational modifications and amino acid substitutions, may hold the key to understanding specific biological states, including mechanisms of resistance. As we continue to refine and develop our analytical tools, our ability to decode these spectra will undoubtedly enhance our understanding of complex biological systems and their responses to environmental challenges.

Declaration of Competing Interest

The authors declare to have no conflict of interests.

Data availability

Data available in Pride. Project accession: PXD043538. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [33] partner repository with the dataset identifier PXD043538.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fiocruz ideias inovadoras (VPPIS-004-FIO-22-2-58), Fundação Araucária (421691/2022-0), CNPq, CAPES, Fundo Sectorial de Salud ANII FSS_X_2022_1_173332.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.105012>.

References

- [1] I. Kyriakidis, E. Vasileiou, Z.D. Pana, A. Tragiannidis, *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms, *Pathog. Basel Switz.* 10 (3) (2021 Mar 19) 373.
- [2] M. Petrillo, A. Angers-Loustau, J. Kreysa, Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*, *Lancet Infect. Dis.* 16 (3) (2016 Mar) 280.
- [3] D.O. Guimarães, L.S. da Momesso, M.T. Pupo, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Quím. Nova.* 33 (3) (2010) 667–679.
- [4] G. Da Silva, S. Domingues, Interplay between Colistin resistance, virulence and fitness in *Acinetobacter baumannii*, *Antibiotics.* 6 (4) (2017 Nov 21) 28.
- [5] L.M. Dalla-Costa, J.M. Coelho, H.A.P.H.M. Souza, M.E.S. Castro, C.J.N. Stier, K. L. Braggagnolo, et al., Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil, *J. Clin. Microbiol.* 41 (7) (2003 Jul) 3403–3406.
- [6] B.J. Langford, M. So, M. Simeonova, V. Leung, J. Lo, T. Kan, et al., Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Microbe, Lancet Microbe* 4 (2023) e179–e191.
- [7] C.J. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G. Robles Aguilar, A. Gray, et al., Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet* 399 (10325) (2022 Feb) 629–655.
- [8] N.A. Rizk, N. Zahreddine, N. Haddad, R. Almadieh, A. Hannun, S. Bou Harb, et al., The impact of antimicrobial stewardship and infection control interventions on *Acinetobacter baumannii* resistance rates in the ICU of a tertiary Care Center in Lebanon, *Antibiotics.* 11 (7) (2022 Jul 7) 911.
- [9] L.R.R. Perez, E. Carniel, G. Dalpiaz, M. Vetter, G.A. Narvaez, C.G. Dias, A four-year follow-up survey of antimicrobial resistance among *Acinetobacter baumannii* complex from inpatients in southern Brazil, *Am. J. Infect. Control* 49 (12) (2021 Dec) 1503–1505.
- [10] K.E. da Silva, W.G. Maciel, J. Croda, R. Cayo, A.C. Ramos, R.O. de Sales, et al., A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit, *PLoS One* 13 (12) (2018), e0209367.

- [11] F. Tsakou, R. Jersie-Christensen, H. Jensen, B. Mojsoska, The role of proteomics in bacterial response to antibiotics, *Pharmaceuticals*. 13 (9) (2020 Aug 27) 214.
- [12] T.B. Lima, M.F.S. Pinto, S.M. Ribeiro, L.A. Lima, J.C. Viana, N.G. Júnior, et al., Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate, *FASEB J.* 27 (4) (2013 Apr) 1291–1303.
- [13] D.E. Foudraïne, N. Strepis, C. Stingl, M.T. ten Kate, A. Verbon, C.H.W. Klaassen, et al., Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae* using proteogenomics, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021 Jun 14) 12472.
- [14] A.C. Palmer, R. Kishony, Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Genet.* 14 (4) (2013 Apr) 243–248.
- [15] S. Abouelhadid, J. Raynes, T. Bui, J. Cuccui, B.W. Wren, Characterization of Posttranslationally Modified Multidrug Efflux Pumps Reveals an Unexpected Link between Glycosylation and Antimicrobial Resistance. Parkhill J, editor, *mBio* 11 (6) (2020 Dec 22) e02604–20.
- [16] P. Wang, R.Q. Li, L. Wang, W.T. Yang, Q.H. Zou, D. Xiao, Proteomic analyses of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to identify drug resistant mechanism, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021 Feb 24) 625430.
- [17] S.E. Cheah, M.D. Johnson, Y. Zhu, B.T. Tsuji, A. Forrest, J.B. Bullitta, et al., Polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*: genetic mutations and transcriptomic changes in response to clinically relevant dosage regimens, *Sci. Rep.* 6 (1) (2016 May 19) 26233.
- [18] M.D.M. Santos, A.C. Camillo-Andrade, D.B. Lima, T.A.C.B. Souza, J.S. de Fischer, G.R.H. da Valente, et al., *DiagnoMass*: A proteomics hub for pinpointing discriminative spectral clusters, *J. Proteome* 277 (2023 Apr) 104853.
- [19] M.D.M. Santos, D.B. Lima, J.S.G. Fischer, M.A. Clasen, L.U. Kurt, A.C. Camillo-Andrade, et al., Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with *PatternLab V*, *Nat. Protoc.* 17 (7) (2022 Jul) 1553–1578.
- [20] A.T. Kong, F.V. Leprevost, D.M. Avtonomov, D. Mellacheruvu, A.I. Nesvizhskii, *MSFragger*: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics, *Nat. Methods* 14 (5) (2017 May) 513–520.
- [21] J. Doellinger, A. Schneider, M. Hoeller, P. Lasch, Sample preparation by easy extraction and digestion (*SPEED*) - a universal, rapid, and detergent-free protocol for proteomics based on acid extraction, *Mol. Cell Proteom. MCP.* 19 (1) (2020 Jan) 209–222.
- [22] J. Rappalber, Y. Ishihama, M. Mann, Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics, *Anal. Chem.* 75 (3) (2003 Feb 1) 663–670.
- [23] H. Hahne, F. Pachi, B. Ruprecht, S.K. Maier, S. Klaeger, D. Helm, et al., DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments, *Nat. Methods* 10 (10) (2013 Oct) 989–991.
- [24] L.U. Kurt, M.A. Clasen, M.D.M. Santos, T.A.C.B. Souza, E.C. Andreassa, E.B. Lyra, et al., *RawVegetable* - a data assessment tool for proteomics and cross-linking mass spectrometry experiments, *J. Proteome* 225 (2020 Aug) 103864.
- [25] S. Na, E. Paek, Quality assessment of tandem mass spectra based on cumulative intensity normalization, *J. Proteome Res.* 5 (12) (2006 Dec 1) 3241–3248.
- [26] M.A. Clasen, L.U. Kurt, M.D.M. Santos, D.B. Lima, F. Liu, F.C. Gozzo, et al., Increasing confidence in proteomic spectral deconvolution through mass defect, Vitek O, editor, *Bioinformatics*. 38 (22) (2022 Nov 15) 5119–5120.
- [27] M.A. Clasen, M.D.M. Santos, L.U. Kurt, J. Fischer, A.C. Camillo-Andrade, L.A. Sales, et al., *PatternLab V* handles multiplex spectra in shotgun proteomic searches and increases identification, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 34 (4) (2023 Apr 5) 794–796.
- [28] J.K. Eng, M.R. Hoopmann, T.A. Jahan, J.D. Egerton, W.S. Noble, M.J. MacCoss, A deeper look into comet-implementation and features, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (11) (2015 Nov) 1865–1874.
- [29] P.C. Carvalho, J.S.G. Fischer, T. Xu, D. Cociorva, T.S. Balbuena, R.H. Valente, et al., Search engine processor: filtering and organizing peptide spectrum matches, *Proteomics*. 12 (7) (2012 Apr) 944–949.
- [30] S. Abouelhadid, J. Raynes, T. Bui, J. Cuccui, B.W. Wren, Characterization of Posttranslationally Modified Multidrug Efflux Pumps Reveals an Unexpected Link between Glycosylation and Antimicrobial Resistance. Parkhill J, editor, *mBio* 11 (6) (2020 Dec 22) e02604–20.
- [31] J.M. Cieslinski, L. Arend, F.F. Tuon, E.P. Silva, R.G.S. Ekermann, L.M. Dalla-Costa, et al., Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 77 (4) (2013 Dec) 337–340.
- [32] C.R.V. Kiffer, T.F.T. Rezende, D.T. Costa-Nobre, A.S.S. Marinonio, L.H. Shigenaga, D.N.O. Kulek, et al., A 7-Year Brazilian National Perspective on Plasmid-Mediated Carbapenem Resistance in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Complex and the Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on Their Occurrence, *Clin. Infect. Dis.* 77 (Supplement 1) (2023 Jul 5) S29–S37.
- [33] Y. Perez-Riverol, J. Bai, C. Bandla, D. García-Seisdedos, S. Hewapathirana, S. Kamatchinathan, et al., The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences, *Nucleic Acids Res.* 50 (D1) (2022 Jan 7) D543–D552.

**ANEXO II – AUTORIZAÇÃO DE USO DO ARTIGO NA COMPOSIÇÃO DA
DISSERTAÇÃO**

Confirmation for use of the article in my master's thesis [240123-012108]



Você respondeu em Qua, 24/01/2024 14:59

PH

Permissions Helpdesk

Para: amandadlin@hotmail.com

Ter, 23/01/2024 15:27

...

Dear Amanda Dal Lin

Thank you for reaching out to us.

As the author of the article from the journal [Journal of Proteomics](#) you are allowed to use it as a whole or in parts in your thesis and no formal permission is required.

Kindly go ahead and use it and ensure to credit the source.

Let me know if you have any further questions.

Kind regards,

Roopa Lingayath

Senior Copyrights Specialist

ELSEVIER | HCM - Health Content Management

Visit [Elsevier Permissions](#)

From: Administrator

Date: Tuesday, January 23, 2024 02:19 AM GMT

Dear Customer

Thank you for contacting Elsevier's Permissions Helpdesk.

This is an automated acknowledgement to confirm we have received your query. Ticket number 240123-012108 has been opened on your behalf and we aim to respond within two business days.

Regards,

Permissions Helpdesk

From: Amanda Dal Lin

Date: Tuesday, January 23, 2024 02:19 AM GMT

Resposta do Especialista Sênior em direitos autorais da revista Elsevier para utilização do artigo na dissertação. Fonte: Microsoft Outlook, 2024.